

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Mihaela Šrajbek

747/PI

**IZOLACIJA BIOAKTIVNIH
SPOJEVA IZ LANENE POGAČE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Škevin uz pomoć dr.sc. Marka Obranovića, višeg asistenta. Diplomski rad izrađen je u sklopu HRZZ projekta broj 9550-Zelena otapala za zelenu tehnologiju.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Dubravki Škevin na prenesenom znanju te stručnim savjetima pri izradi diplomskog rada. Zahvaljujem se dr. sc. Marku Obranoviću na izdvojenom vremenu, pomoći i pristupačnosti tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Posebno hvala mojim roditeljima na omogućenom školovanju te beskrajnoj podršci i poticaju tijekom studija. Hvala sestri Žaklini na motivaciji tijekom studija te na pruženoj pomoći i podršci u najtežim i najpotrebnijim trenucima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

IZOLACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ LANENE POGAČE

Mihaela Šrajbek, 747/PI

Sažetak: Lanena pogača je nusproizvod bogat fenolnim spojevima te se može koristiti kao jeftina sirovina za njihovu ekstrakciju. Cilj rada bio je ispitati utjecaj mikrovalova na ekstraktibilnost bioaktivnih spojeva u usporedbi s klasičnim metodama. U radu su, pomoću uobičajenih metoda ekstrakcije i mikrovalnom ekstrakcijom izolirani i određeni: sekoizolaricirezinol-diglukozid (SDG) te glukozidi *p*-kumarinske i ferulinske kiseline - spojevi iz lanene pogače, koja je dobivena nakon hladnog prešanja. Standardnom metodom ekstrakcije iz lanene pogače određeni su: SDG (21,98 mg g⁻¹), glukozid *p*-kumarinske kiseline (10,46 mg g⁻¹) te glukozid ferulinske kiseline (5,12 mg g⁻¹). Mikrovalnom ekstrakcijom dobivene su znatno veće vrijednosti navedenih spojeva uz značajno skraćanje vremena ekstrakcije (preko 95%) i smanjenja upotrebe otapala. Maksimalne količine ekstrahirane mikrovalnom ekstrakcijom za SDG bile su 28,96 mg g⁻¹, za glukozid *p*-kumarinske kiseline 18,06 mg g⁻¹ i glukozid ferulinske kiseline 8,98 mg g⁻¹.

Ključne riječi: Lanena pogača, SDG, glukozid *p*-kumarinske kiseline, glukozid ferulinske kiseline, mikrovalna ekstrakcija

Rad sadrži: 50 stranica, 20 slika, 8 tablica, 61 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Dubravka Škevin

Pomoć pri izradi: dr. sc. Marko Obranović, viši asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
2. Prof.dr.sc. Dubravka Škevin
3. Doc.dr.sc. Klara Kraljić
4. Doc.dr.sc. Nikolina Čukelj (zamjena)

Datum obrane: 19. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

ISOLATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM FLAXSEED CAKE

Mihaela Šrajbek, 747/PI

Abstract: Flaxseed cake is a byproduct which contains high amounts of phenolic compounds, so it can be used as a cheap material for their extraction. The aim of this study was to examine the effect of microwaves on the extractability of bioactive compounds compared to regular methods. In this paper, the following compounds from the flaxseed cake, obtained after cold pressing, were isolated and identified: secoisolariciresinol diglucoside (SDG), *p*-coumaric acid glucoside and ferulic acid glucoside, using both regular extraction methods and a microwave-assisted extraction. By using the regular method, it was found that the major phenolic compound of flaxseed cake is: SDG (21,98 mg g⁻¹), then *p*-coumaric acid glucoside (10,46 mg g⁻¹) and ferulic acid glucoside (5,12 mg g⁻¹). Microwave-assisted extraction resulted in significantly higher values of mentioned compounds, with a significantly shortened time of extraction (more than 95%) and reduction of solvent usage. The maximum amounts extracted by microwave-assisted extraction were for SDG 28,96 mg g⁻¹, *p*-coumaric acid glucoside 18,06 mg g⁻¹ and ferulic acid glucoside 8,98 mg g⁻¹.

Keywords: flaxseed cake, SDG, *p*-coumaric acid glucoside, ferulic acid glucoside, microwave-assisted extraction

Thesis contains: 50 pages, 20 figures, 8 tables, 61 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. Dubravka Škevin, Full professor

Technical support and assistance: PhD. Marko Obranović, senior assistant

Reviewers:

1. PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Full professor
2. PhD. Dubravka Škevin, Full professor
3. PhD. Klara Kraljić, Assistant professor
4. PhD. Nikolina Čukelj, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 19 July 2017

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. LAN	2
2.2. LANENO ULJE.....	3
2.2.1. Kemijski sastav lanenog ulja	4
2.2.2. Hladno prešano laneno ulje	7
2.3. LANENA POGAČA	7
2.4. FENOLNI SPOJEVI	8
2.5. LIGNANI	9
2.5.1. Utjecaj lignana na ljudsko zdravlje	12
2.5.2. Antioksidativna aktivnost lignana.....	12
2.6. REFERENTNE METODE IZOLACIJE	13
2.7. EKSTRAKCIJA MIKROVALOVIMA	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Uzorci	17
3.1.2. Reagensi i standardi.....	17
3.1.3. Aparatura.....	18
3.2. METODE RADA.....	19
3.2.1. Određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u lanenom sjemenu i pogači.....	19
3.2.2. Određivanje udjela ulja u lanenom sjemenu i pogači.....	20
3.2.3. Proizvodnja ulja.....	20
3.2.4. Iskorištenje procesa proizvodnje ulja	21
3.2.5. Referentna metoda ekstrakcije lignana.....	21
3.2.6. Ekstrakcija lignana i fenolnih spojeva na tresilici.....	22
3.2.7. Ekstrakcija lignana i fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru/reaktoru.....	22
3.2.8. Plan pokusa za ekstrakciju fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru/reaktoru...	22
3.2.9. Određivanje sastava lignana i fenolnih spojeva lanene pogače	23
3.2.10. Statistika.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. KVALITETA LANENOG SJEMENA I POGAČE	26
4.2. ISKORIŠTENJE PROCESA PROIZVODNJE ULJA	28
4.3. EKSTRAKCIJA LIGNANA REFERENTNOM METODOM	28
4.4. EKSTRAKCIJA NA TRESILICI	29
4.5. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA	33
5. ZAKLJUČCI	43
6. LITERATURA	44

1. UVOD

Lan je biljka koja se tijekom povijesti ponajprije uzgajala za proizvodnju visoko cijenjenih vlakana. Osim nadaleko poznatih lanenih vlakana, lan se koristi i za proizvodnju ulja. Smatra se da je, zbog visokog sadržaja ω -3-masnih kiselina, laneno ulje jedno od nutritivno najvrijednijih ulja. Stoga, proizvodnja hladno prešanog lanenog ulja posljednjih godina bilježi stalni porast. Problem kod proizvodnje ulja prešanjem predstavlja zbrinjavanje nusproizvoda, tj. pogače. Lanena pogača se uglavnom koristi kao hrana za životinje, no zbog bogatog nutritivnog sastava potencijalna je sirovina za dobivanje važnih bioaktivnih spojeva.

Fenoli su spojevi koji biljkama služe za obranu, a kod ljudi su važni u sprječavanju raznih vrsta bolesti, jer kao antioksidansi sprečavaju nastanak slobodnih radikala u organizmu.

Poznato je mnogo metoda za ekstrakciju fenolnih spojeva, no zajedničko većini je dugo trajanje ekstrakcije uz veliki utrošak energije i otapala. Stoga se u novije vrijeme istražuju nove tehnike kojima je moguće dobiti slične udjele ekstrahiranih tvari kao i uobičajenim metodama, ali uz kraće vrijeme i uz manji utrošak energije. Jedna od takvih metoda je mikrovalna ekstrakcija, kojom je moguće osim znatno kraćeg vremena ekstrakcije smanjiti upotrebu otapala.

U ovom radu odredit će se udjeli fenolnih spojeva, posebice lignana i fenolnih kiselina iz dobivene lanene pogače uz pomoć uobičajenih metoda ekstrakcije te ekstrakcije mikrovalovima. Odredit će se najučinkovitiji parametri za ekstrakciju navedenih fenolnih spojeva te će se usporediti dobiveni rezultati.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LAN

Lan (*Linum usitatissimum* L.) je jednogodišnja biljka stara oko 7000 godina, a spada u porodicu *Linaceae* (lanovi) te rod *Linum* (slika 1) (Toplak Galle, 2001; Przybylski, 2005). Ime mu potječe od keltske riječi *lin* što znači „nit“ i latinske riječi *usitatissimum* što znači „najkorisniji“ (Muir i Westcott, 2003). U prirodi se rijetko nalazi kao samonikla, a kultivira se u različitim dijelovima svijeta, kao npr. u Kanadi, Kini, SAD-u, Indiji itd. Tijekom povijesti se najviše proizvodio zbog vlakana za izradu platna. Međutim, danas se koristi i za proizvodnju ulja, boja i drugih industrijskih proizvoda te je stekao veliki značaj u ljudskoj prehrani zbog bogatog nutritivnog sastava (Toplak Galle, 2001; Herchi i sur., 2014). Sorte lana koje se koriste za proizvodnju tekstilnih vlakana obično imaju dužu stabljiku, visine 80-120 cm i manje sjemenki, dok sorte koje se koriste za dobivanje ulja imaju kraće i jako razgranate stabljike, visine oko 60-80 cm te veći broj sjemenki (Kochhar, 2011).



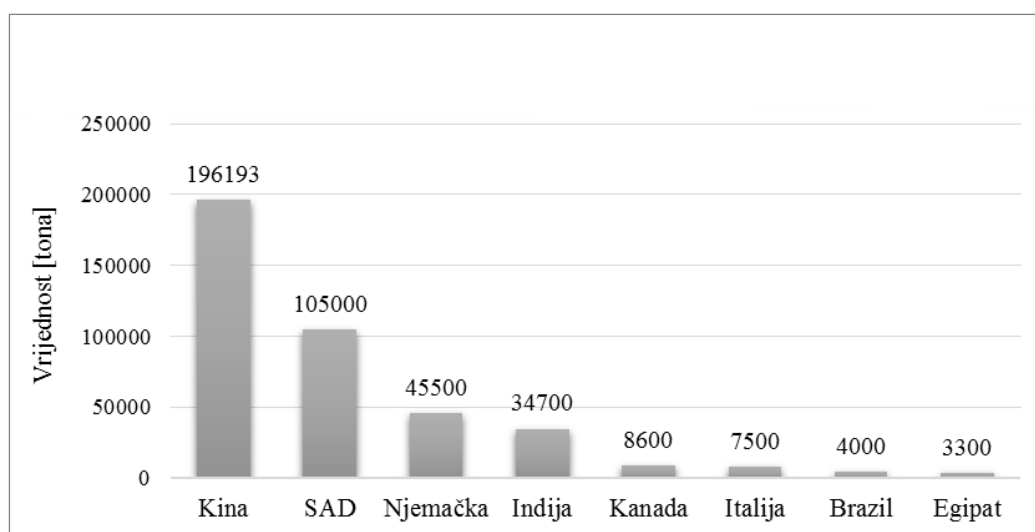
Slika 1. Lan (*Linum Usitatissimum* L.) (B&B Podžumberak, 2017)

Postoje dvije osnovne vrste sjemenki lana, to su: smeđa i žuta, odnosno zlatna. Smeđi lan je bolje poznat kao sastojak u bojama, lakovima i hrani za životinje. No obje vrste imaju sličan nutritivni sastav (Goyal i sur., 2014). Laneno sjeme sadrži oko 41% ulja (od čega je otprilike 73% polinezasićenih masnih kiselina), 28% vlakna, 21% proteina te topive polisaharide, lignane, fenolne spojeve, vitamine i mineralne tvari (Sharav i sur., 2014; Goyal i sur., 2014).

Nutritivne i zdravstvene vrijednosti lana potječu od ω -3-masnih kiselina i polifenola. Najviše zastupljena masna kiselina u lanenom sjemenu je α -linolenska kiselina (ALA) (ω -3-masna kiselina). Laneno sjeme je jedan od najvećih izvora lignana, a najviše sadrži sekoizolaricirezinol-diglukozid (SDG). Međutim, osim lignana, sjeme sadrži veliku količinu fenolnih kiselina i to čak 8-10 g mg^{-1} sjemena (Herchi i sur., 2014). Najzastupljenije fenolne kiseline lana su *trans*-ferulinska i *p*-kumarinska kiselina te one dolaze u obliku glukozida (Beejmohun i sur., 2007), dok su *trans*-kavska, klorogenska, galna, sinapinska, protokatehinska i *p*-hidroksibenzojeva kiselina zastupljene u manjoj količini (Sharav i sur., 2014).

2.2. LANENO ULJE

Lan je jedna od glavnih uljarica, čije se ulje koristi diljem svijeta (Herchi i sur., 2014). Ukupna svjetska proizvodnja lanenog ulja u 2014. godini iznosila je 686 498 tona (slika 2), što ga svrstava na 12. mjesto svjetske proizvodnje biljnih ulja (FAOSTAT, 2017). To je ekonomski važna uljarica, jer sadrži više od 40% ulja (Choo, 2007).



Slika 2. Glavni svjetski proizvođači lanenog ulja u 2014. godini (FAOSTAT, 2017)

Ovisno o izvoru, ulje sadrži različiti udio masnih kiselina. Naime, laneno ulje iz kultura u umjerenim klimatskim uvjetima sadrži više nezasićenih masnih kiselina od ulja iz toplijih krajeva (Toplak Galle, 2001). Iako je zbog visokog sadržaja nezasićenih masnih kiselina laneno ulje nutritivno vrijedan proizvod, takav kemijski sastav čini ga osjetljivim na oksidaciju. Oksidacija ulja, nastala bilo zbog nepravilne prerade ili skladištenja, smanjuje njegovu

nutritivnu vrijednost i uzrokuje nastanak nepoželjnih tvari. Unatoč sastojcima koji su odgovorni za njegovu nestabilnost, laneno sjeme sadrži velik broj antioksidansa koji imaju zaštitni učinak tijekom skladištenja (Sharav i sur., 2014). Bioaktivne tvari lanenog sjemena s antioksidativnim učinkom su lignani, fenolne kiseline, antocijani, flavonoli, flavoni, fitinske kiseline te tokokromanoli i karotenoidi (Sharav i sur., 2014; Goyal i sur., 2014; Obranović i sur., 2015). Koncentracija navedenih antioksidansa u lanenom ulju ovisi o provedenom postupku izdvajanja ulja i obradi ulja. Dakle, rafinacijom se dobivaju ulja sa manjim udjelom antioksidansa, dok su nerafinirana ulja bogatija antioksidansima te imaju veću nutritivnu vrijednost (Sharav i sur., 2014). Fizikalno-kemijska svojstva lanenog ulja prikazana su u tablici 1 (Kochhar, 2011).

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva lanenog ulja (Kochhar, 2011)

Svojstvo	Vrijednost
Specifična težina (25°C)	0,924-0,936
Indeks loma (25°C)	1,477-1,482
Jodni broj	170-203
Osapunjivi dio	188-196
Neosapunjivi dio (%)	0,1-2,0

2.2.1. Kemijski sastav lanenog ulja

U tablici 2 prikazan je sastav sterola lanenog ulja. Laneno ulje sadrži 0,42% ukupnih sterola. Dominantan sterol je β -sitosterol, kojeg ima iznad 45% od ukupnih sterola, a zatim slijede kampesterol, Δ^5 -avenasterol, stigmasterol te drugi, zastupljeni u manjoj količini (Kochhar, 2011). Steroli koji se nalaze u biljnim uljima inhibiraju apsorpciju kolesterola. Kemijska struktura sterola je slična strukturi kolesterola, no mehanizam apsorpcije sterola u ljudskom organizmu se razlikuje od apsorpcije kolesterola. Steroli se u vrlo maloj količini apsorbiraju u crijevima te na taj način inhibiraju apsorpciju kolesterola i utječu na njegovu eliminaciju (Deng i sur., 2012).

Tablica 2. Sastav sterola lanenog ulja (Kochhar, 2011)

Steroli	Vrijednost (% od ukupnih)
Brasikasterol	0,1-0,7
Kampesterol	25-31
Stigmasterol	6-9
β -sitosterol	45-53
Δ^5 -avenasterol	8-12
Ukupno (mg kg⁻¹)	422

Laneno ulje sadrži vrlo mali udio zasićenih masnih kiselina (oko 9%) i mononezasićenih masnih kiselina (oko 18%), dok glavninu čine polinezasićene masne kiseline (oko 73%). Najzastupljenija masna kiselina je ALA (18:3) čiji udio varira od 39% do 60%, zatim slijede oleinska (18:1), linolna (18:2) (ω -6-masna kiselina), palmitinska (16:0) i stearinska (18:0) (tablica 3). Stoga, laneno ulje pruža izvrstan omjer ω -6-masnih kiselina i ω -3-masnih kiselina. Naime, omjer ω -6-masnih kiselina i ω -3-masnih kiselina je približno 0,3:1 (Goyal i sur., 2014). Osim toga, ALA je esencijalna masna kiselina koja se u ljudskom tijelu može prevesti u eikozapentaensku (EPA) i dokozaheksaensku kiselinu (DHA), za koje je dokazano da imaju pozitivan učinak na zdravlje ljudi (Zhang i sur., 2013).

Tablica 3. Sastav masnih kiselina lanenog ulja (Kochhar, 2011)

Masne kiseline	Vrijednost (% od ukupnih)
16:0	5,7-7
18:0	3-4
18:1	20-20,3
18:2	17-17,3
18:3	52-54

Tokokromanoli su važan sastojak lanenog ulja zbog svog antioksidativnog učinka (Zhang i sur., 2013; Obranović i sur., 2015). To su grupa spojeva koju čine četiri tokoferola (α -, β -, γ - i δ -) te četiri tokotrienola (α -, β -, γ - i δ -) (Obranović i sur., 2015). Tokoferole karakterizira supstituirana benzopiranska prstenasta struktura, pa se prema različitim supstituentima dijele na α -, β -, γ - i

δ-tokoferole. Dominantan tokoferol lanenog ulja je γ-tokoferol, dok je udio ostalih tokoferola gotovo zanemariv (tablica 4). Laneno ulje još sadrži i tokotrienole te plastokromanol-8 (Ahmed i sur., 2005). Plastokromanol-8 je prirodni derivat γ-tokotrienola. Plastokromanol-8 čini više od 25% ukupnih tokokromanola lanenog ulja, stoga je on drugi najzastupljeniji tokokromanol u lanenom ulju (Obranović i sur., 2015). No gledajući sastav ukupnih tokoferola, tokotrienola i plastokromanola-8, laneno ulje sadrži znatno manju koncentraciju ovih antioksidansa u odnosu na repičino, sojino i suncokretovo ulje (Ahmed i sur., 2005).

Tablica 4. Sastav tokoferola lanenog ulja (Kochhar, 2011)

Tokoferoli	Vrijednost (mg kg ⁻¹)
α-tokoferol	5-10
γ-tokoferol	430-575
δ-tokoferol	4-8
Ukupno	440-588

Sadržaj proteina u lanenom sjemenu varira. Najviše ima globulina, a zatim glutelina. Osim proteina, lan sadrži bioaktivne peptide, to su ciklolinopeptidi, koji zbog svoje hidrofobnosti lako prelaze u ulje. Ciklolinopeptidi imaju snažnu antioksidativnu, imunosupresivnu i antimalaričnu aktivnost, jer inhibiraju ljudski malarični parazit *Plasmodium falciparum* (Goyal i sur., 2014; Sharav i sur., 2014).

Smatra se da laneno ulje potpomaže mentalnoj i fizičkoj izdržljivosti te sudjeluje u kontroli procesa starenja kože. Naime, laneno ulje poboljšava vlažnost, čvrstoću i elastičnost kože na način da poboljšava zadržavanje vlage, stoga pomaže u liječenju suhe i pothranjene kože. Osim toga, zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina, ω-6 i ω-3-masnih kiselina, sudjeluje u reguliranju sinteze prostaglanidina te zbog toga sudjeluje u zacjeljivanju rana i djeluje protuupalno. Laneno ulje također ima antitumorsko djelovanje te se koristi kao diuretik za liječenje bolesti bubrega te za liječenje poremećaja gastrointestinalnog trakta (Goyal i sur., 2014).

2.2.2. Hladno prešano laneno ulje

Hladno prešana ulja su proizvodi koji se dobivaju iz odgovarajućih sirovina, prešanjem na temperaturi do 50 °C. Može se provesti i postupak čišćenja odnosno bistrenja pranjem vodom, dekantiranjem, filtriranjem i centrifugiranjem (Pravilnik, 2012). Prije samog prešanja sjemenke moraju biti očišćene i osušene do optimalne vlažnosti (CCFO22, 2011). Hladno prešanje je tradicionalan i prirodan način proizvodnje ulja. Ulje se jednostavno pod pritiskom izdvoji iz sjemena pri temperaturama nižim od 50°C, što osigurava zadržavanje arome i karaktera samog ulja. Ovim postupkom se toplina ne dovodi izvana, ali dolazi do blagog povišenja temperature, jer toplina nastaje uslijed pritiska i rotacije što uzrokuje trenje. Rezultat hladnog prešanja su ulja sa visokim sadržajem antioksidansa te ω -6 i ω -3 masnih kiselina, bez nastanka *trans*-masnih kiselina. Stoga, potrošnja hladnih prešanih ulja u svijetu u stalnom je porastu (CCFO24, 2015).

Hladno prešano laneno ulje je svijetlocrvene boje te ima vrlo nisku oksidativnu stabilnost, zbog visokog sadržaja ALA. Zbog toga se takvo laneno ulje mora skladištiti na hladnom mjestu, bez prisustva kisika te zaštićenom od svjetlosti (Kochhar, 2011).

2.3. LANENA POGAČA

Lanena pogača je nusproizvod kod proizvodnje lanenog ulja prešanjem (Herchi i sur., 2014). Uglavnom se koristi kao hrana za životinje, ali se još upotrebljava i kao aditiv u pekarskoj industriji (Gutiérrez i sur., 2010). Bogata je vlaknima, proteinima i lignanima (Herchi i sur., 2014).

Lanena vlakna su jedna među najstarijima na svijetu. Proizvodnja lanenih vlakna potječe još iz drevnog Egipta. To je prirodni i biorazgradivi materijal, dobrih mehaničkih karakteristika. Lanena vlakna su čvršća u odnosu na pamukova vlakna, ali su manje elastična. Koriste se kao sirovina u industriji visokokvalitetnog papira, za proizvodnju cigaretnog papira, čajnih vrećica i za tiskanje novčanica. Lanena vlakna se dijele na topiva i netopiva. Općenito, omjer topivih i netopivih vlakna je 20:80, odnosno 40:60. Glavna frakcija netopivih vlakana sastoji se od celuloze i lignina, dok frakciju topivih vlakana čine gume i sluzi. Netopiva vlakna povećavaju volumen crijeva te zbog toga imaju laksativan učinak i sprječavaju konstipaciju. S druge strane, topiva vlakna održavaju razinu glukoze u krvi i utječu na sniženje razine kolesterola u krvi (Goyal i sur., 2014).

Proteini lanene pogače bogati su argininom, asparaginskom i glutaminskom kiselinom (Gutiérrez i sur., 2010), razgranatim aminokiselinama, poput valina i leucina te aromatskim aminokiselinama, poput tirozina i fenilalanina. Osim proteina, pogača sadrži bioaktivne peptide, za koje se smatra da smanjuju rizik od oboljenja kardiovaskularnih bolesti (Goyal i sur., 2014).

Od mineralnih tvari lanene pogače ističu se kalcij, magnezij i fosfor. Također, sadrži i kalij, koji potpomaže u sprječavanju nastanka moždanog udara te smanjuje agregaciju trombocita u krvi (Goyal i sur., 2014).

Zbog velikog sadržaja polisaharida, koji se mogu izdvojiti iz lanene pogače, lan dobiva sve veću važnost te se koristi kao funkcionalna hrana. Osim što polisaharidi imaju pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi, naročito topiva vlakna, važna su njihova fizikalna svojstva, prvenstveno kao zgušnjivači i emulgatori. Moguća primjena lanenih polisaharida je da se koriste za konzerviranje hrane, čime bi zamijenili kemijske aditive. Naime, smatra se da neki oligosaharidi i polisaharidi imaju antimikrobna svojstva. Osim toga, određeni polisaharidi imaju svojstva prebiotika, odnosno potiču rast crijevne mikroflore. Sluzi, dobivene iz lanene pogače imaju emulgirajuća svojstva slična gumi arabika te sposobnost vezanja vode slična guar gumi (Gutiérrez i sur., 2010). Lanena pogača je prihvaćena na svjetskom tržištu, a dolazi kao komponenta u raznim žitaricama za doručak, kruhovima, keksima te dresinzima za salate (Touré i Xueming, 2010).

2.4. FENOLNI SPOJEVI

Pojam fenolni spojevi obuhvaća niz kemijskih spojeva različite kemijske strukture (Cheynier, 2005). Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka (El Gharras, 2009), a u biljnom svijetu čine jednu od najbrojnijih i najšire rasprostranjenih skupina spojeva, s više od 8000 trenutno poznatih struktura. Pozitivno utječu na otpornost biljke prema bolestima i mikroorganizmima, štite osjetljive stanične dijelove od štetnog zračenja te neki fenolni spojevi indirektno utječu na rast biljke (Šubarić i sur., 2010). Zbog strukturne raznolikosti mogu se podijeliti u nekoliko grupa ovisno o podrijetlu, biološkoj funkciji i kemijskoj aktivnosti (Tsao, 2010). No općenito fenolni spojevi se dijele na flavonoide i neflavonoide (Andrés-Lacueva i sur., 2010).

Flavonoidi su najzastupljenija i najveća skupina fenolnih spojeva. Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan ($C_6C_3C_6$), odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol. Zapravo, strukturu flavonoida čine tri fenolna prstena: A, B i C prsten. Benzenski prsteni A i B

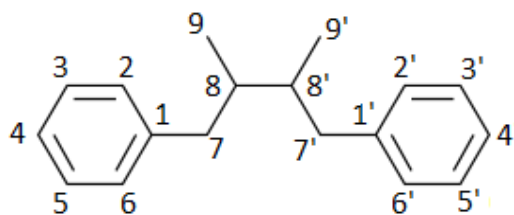
povezani su preko tročlanog alifatskog niza, koji zajedno s kisikom tvori šesteročlani prsten C (Kazazić, 2004). Flavonoidi se mogu podijeliti u nekoliko podskupina. To su: antocijani, flavan-3-oli, flavoni, flavanoni, flavonoli, izoflavoni i neoflavonoidi (Tsao, 2010). C- i O-glikozidi flavona čine najveći dio flavonoida lana (Herchi, i sur., 2014).

U neflavonoide se ubrajaju: fenolne kiseline, hidrolizirajući tanini, acetofenoni, kumarini, lignani te mnogi drugi. Svaka od podskupina ima vezanu neku supstitucijsku skupinu (Tsao i McCallum, 2010).

Fenolne kiseline su derivati benzojeve i cimetine kiseline. Stoga se razlikuju dvije vrste fenolnih kiselina: hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetine kiseline. Hidroksibenzojeve kiseline imaju C6-C1 strukturu, dok hidroksicimetine kiseline imaju C6-C3 strukturu (Ignat i sur., 2011). Hidroksibenzojeve kiseline većinom su komponente složenih struktura, kao što su hidrolizirani tanini (npr. galotanini i elagitanini). Hidroksicimetine kiseline se rijetko nalaze u slobodnom obliku, a uglavnom su prisutne u obliku glikoziliranih derivata. Hidroksicimetine kiseline su: *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina (El Gharras, 2009). Međutim, većina fenolnih kiselina prisutnih u lanu, poput *p*-hidroksibenzojeve, *trans*-ferulinske i *trans-p*-kumarinske kiseline, nalaze se u obliku estera (Kasote, 2013). Glukozidi hidroksicimernih kiselina prisutni u lanu, naročito glukozidi *p*-kumarinske i ferulinske kiseline, imaju antioksidativna svojstva te su od posebnog značaja u dermatologiji (Beejmohun i sur., 2007).

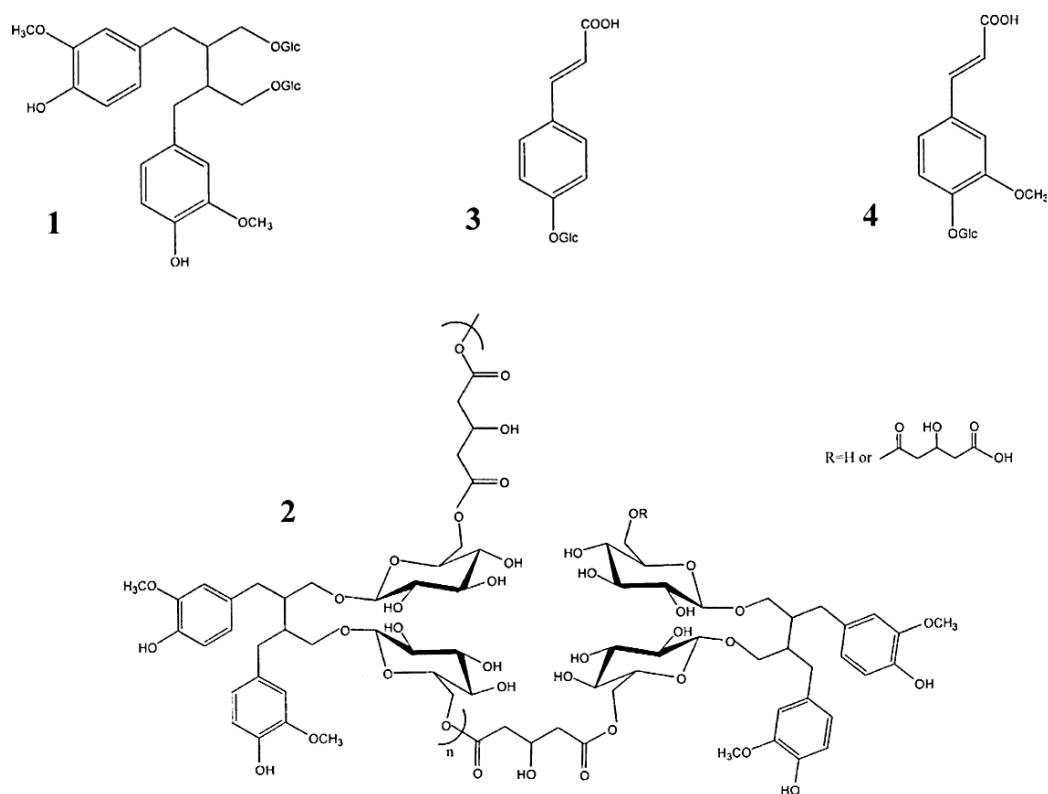
2.5. LIGNANI

Lignani su fenolni spojevi nastali dimerizacijom dviju cinaminskih kiselina (slika 3) (Goyal i sur., 2014), a ubrajaju se u skupinu neflavonoida (Andrés-Lacueva i sur., 2010). To su zapravo sekundarni biljni metaboliti, koji biljkama služe za obranu (Nemes i Orsat, 2011). Sveprisutni su u biljnom svijetu (Goyal i sur., 2014), a sadrže ih još i vino, pivo, kava i čaj (Andrés-Lacueva i sur., 2010). Nalaze se u gotovo svim biljkama (Goyal i sur., 2014), no lan je jedan od najvećih izvora lignana iz biljaka (Herchi i sur., 2014). Ubrajaju se u fitoestrogene te smanjuju učestalost pojave raka dojke i prostate, na način da mijenjaju sintezu, bioraspoloživost i aktivnost steroidnih hormona, s obzirom da djeluju na estrogene receptore. Osim toga, lignani smanjuju učestalost pojave raka debelog crijeva te raka štitnjače, rizika pojave dijabetesa tipa 1 i 2 te razinu lošeg kolesterola u krvi (Nemes i Orsat, 2011; Beejmohun i sur., 2007).

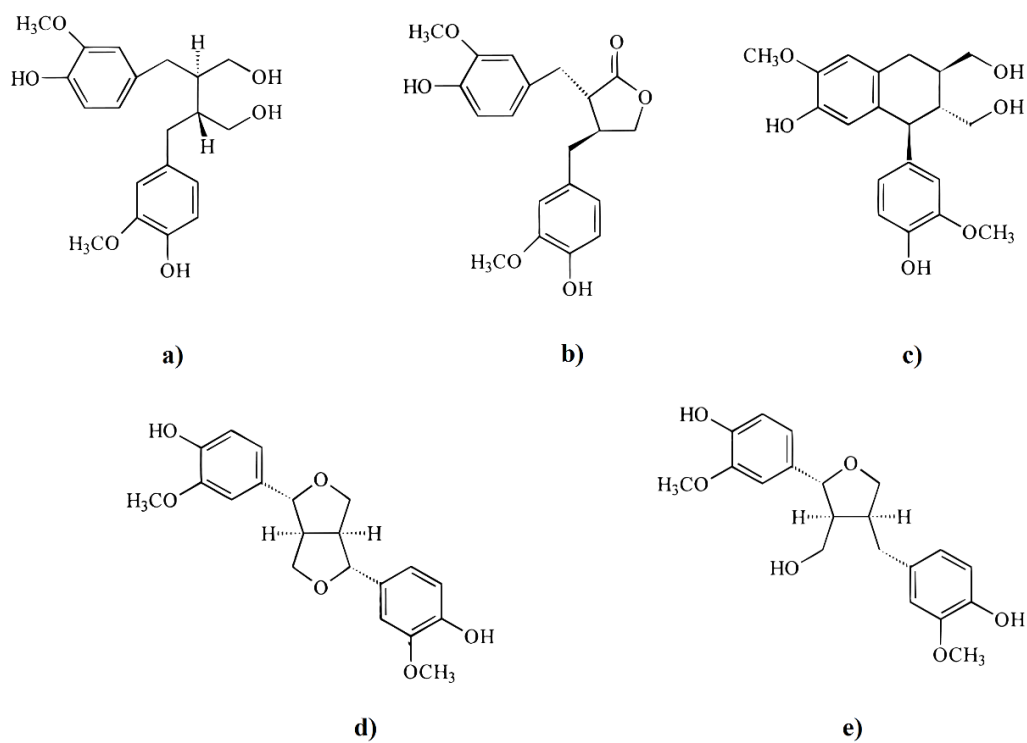


Slika 3. Osnovna struktura lignana (IUPAC-IUB, 2000)

Najzastupljeniji lignan lana je sekoizolaricirezinol diglukozid (SDG). Sekoizolaricirezinol (SECO) (slika 5) je aglikon SDG-a. SDG- β -D-glukozidaza hidrolizira glukopiranozidnu vezu SDG-a te se oslobađa SECO. U lanu je SDG esterskim vezama vezan na 3-hidroksi-3-metilglutarnu kiselinu (HMGA) (Kasote, 2013), čime nastaje SDG-HMG kompleks (Beejmohun i sur., 2007), ali i na druge fenolne spojeve, kao što su glukozidi *p*-kumarinske i ferulinske kiseline čime nastaju oligomeri SDG-a (slika 4). Osim SDG-a, u lanu su nađeni u manjoj količini i drugi tipovi lignana, poput matairezina, pinorezina, laricirezina i izolaricirezina (slika 5). Sadržaj SDG-a u lanu varira s obzirom na sortu te vrijeme i mjesto rasta (Kasote, 2013). Lignani izolirani iz lana, naročito SDG, komercijalno su dostupni kao dodatci prehrani (Goyal i sur., 2014).



Slika 4. Strukturne formule sekoizolaricirezinol diglukozida (1), SDG-HMG kompleksa (2), glukozida *p*-kumarinske kiseline (3) i glukozida ferulinske kiseline (4) (Beejmohun i sur., 2007)



Slika 5. Strukturne formule lignana: a) sekoizolaricirezinol, b) matairezinol, c) izolaricirezinol, d) pinoresinol i e) laricirezinol (Meagher i sur., 1999)

2.5.1. Utjecaj lignana na ljudsko zdravlje

Lignani su poznati kao antioksidansi i fitoestrogeni. Smatra se da lignani prisutni u lanu sprječavaju nastanak šećerne bolesti. Šećerna bolest je glavni uzrok nastajanja kardiovaskularnih bolesti, a praćena je povišenom razinom glukoze u krvi, odnosno hiperglikemijom. Lignani lana inhibiraju ekspresiju gena fosfoenolpiruvat karboksikinaze, koji kodira ključni enzim odgovoran za sintezu glukoze u jetri. Naime, provedeno je istraživanje na bolesnicima kojima je dijagnosticiran dijabetes tipa 2. Ti bolesnici su uzimali lan u obliku praška, kao dodatak prehrani tijekom jednog mjeseca. Nakon mjesec dana ustanovilo se da je koncentracija glukoze u krvi smanjena za 19,7%, a glikiranog hemoglobina za 15,6%. Uzrok tome je vrlo vjerojatno niska koncentracija jednostavnih šećera, a visoka koncentracija prehrambenih vlakna u lanu (Goyal i sur., 2014).

Nadalje, istraživanja pokazuju povezanost između konzumacije lana i smanjenja rizika od nastanka raka. Laboratorijskim istraživanjima na štakorima je dokazano da lan inhibira nastajanje raka debelog crijeva, dojke, kože i pluća. Više razine inzulina i IGF-1 (inzulinu sličan faktor rasta 1) povećavaju rizik od nastanka raka, naročito raka debelog crijeva i gušterače. S obzirom na to, različita istraživanja ukazuju da konzumacijom lana, kao dodatka prehrani, dolazi do smanjenja razine inzulina i IGF-1. Osim toga, zbog visokog sadržaja SDG-a smatra se da lan smanjuje rizik od nastanka raka dojke. Dakle, pozitivni učinci lana, tj. smanjenje rizika od nastajanja raznih vrsta raka, potječu od vrlo visokih koncentracija lignana. Lan je jedan od najvećih izvora lignana iz biljaka, koji imaju antioksidativno djelovanje te također mijenjaju metabolizam estrogena, čime se može smanjiti rizik od nastanka raka jajnika (Goyal i sur., 2014).

Neki lignani se uz pomoć crijevne mikroflore prevode do enterodiola (ED) i enterolaktona (EL) te na taj način imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Takvi lignani su SDG, SECO, matairezinol, pinoresinol, laricirezinol, izolaricirezinol i dr. (Nemes i Orsat, 2011). Naime, ED i EL zbog svoje strukturne sličnosti s humanim estrogenom, 17- β -estradiolom (E2), imaju afinitet vezanja za estrogene receptore. Mogući zaštitni učinak od nastajanja raka dojke lignani lana posjeduju zbog svoje estrogene i antioksidativne aktivnosti (Goyal i sur., 2014).

2.5.2. Antioksidativna aktivnost lignana

S obzirom na način djelovanja, antioksidansi se mogu podijeliti u dvije grupe:

1. primarni antioksidansi i
2. sekundarni antioksidansi.

Primarni antioksidansi doniraju atom vodika, odnosno oni direktno hvataju slobodne radikale. Mehanizam djelovanja sekundarnih antioksidansa ne uključuje direktno hvatanje slobodnih radikala, već oni djeluju na nekoliko načina: vežu kisik, apsorbiraju UV-zračenje, inhibiraju enzime, razlažu hidroperokside ili vežu ione metala, koji kataliziraju reakciju oksidacije (Pokorny i sur., 2001; Kasote, 2013).

Reakcija oksidacije rezultira nastankom nepoželjnog okusa, boje i mirisa hrane kao i gubitka nutritivne vrijednosti. Nadalje, kao produkti oksidacije mogu nastati potencijalno toksični spojevi. Zbog toga, postoji potreba dodatka antioksidansa, kako bi se sačuvao okus, boja i miris, odnosno izbjeglo kvarenje hrane. U tu svrhu se koriste prirodni i sintetski antioksidansi (Kasote, 2013). No opće prihvaćena činjenica je da su prirodni antioksidansi učinkovitiji i sigurniji (Yanishlieva-Maslarova i Heinonen, 2001).

Slobodni radikali, reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi (ROS/RNS) nastaju u ljudskom organizmu tijekom metaboličkih procesa i neophodni su za opskrbu energijom, detoksikaciju te funkciju imunološkog sustava. Međutim, zbog nastanka ovih spojeva u prevelikoj količini i izloženosti vanjskim oksidansima može doći do oštećenja biološki važnih molekula, poput DNA, lipida i proteina. Poznato je da su nastala oštećenja povezana s povećanim rizikom nastanka degenerativnih bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, rak itd. (Kasote, 2013).

SDG djeluje antioksidativno tako što direktno uklanja slobodne radikale ili tako što inhibira lipidnu peroksidaciju. Istraživanjima je utvrđeno da SDG i EL učinkovitije inhibiraju lipidnu peroksidaciju od ED. Nadalje, SDG i SECO imaju sposobnost hvatanja radikala tako što doniraju vodik, a time inhibiraju reakciju propagacije. Utvrđeno je da lignani SDG, SECO, EL i ED imaju jednaku, odnosno u nekim slučajevima veću antioksidativnu aktivnost od vitamina E i sintetskih antioksidansa. Dakle, lignani lana mogu biti alternativa sintetskim antioksidansima te se mogu koristiti u prehrambenoj industriji kao stabilizatori i nutraceutici (Kasote, 2013).

2.6. REFERENTNE METODE IZOLACIJE

Poznato je da sadržaj lignana u sjemenkama lana varira s obzirom na sortu, ali i mjesto uzgoja i godinu. Zbog toga je teško kvantificirati lignane u hrani, a isto tako je nepraktično i naporno analizirati različite sorte sjemenki uljarica ili zrna žitarica, koje su ubrane na različitim mjestima

i u različitom vremenskom razdoblju. Međutim, postoje brojne metode ekstrakcije i analize lignana koje se koriste u istraživanjima (Nemes i Orsat, 2012).

Prvi korak u izolaciji lignana, odnosno njihovih glikozida iz biljnog materijala je ekstrakcija (Maegher i sur., 1999). Ekstrakcija je zapravo proces izdvajanja neke tvari iz čvrste ili tekuće smjese prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka smjese. Princip ekstrakcije je molekulska difuzija, koju karakterizira izjednačavanje koncentracija otopljenih tvari u sustavima koji su u međusobnom dodiru (Lovrić, 2003).

Interes za razvoj metoda za ekstrakciju, analizu i kvantifikaciju lignana u biljnim izvorima, a naročito u lanenom sjemenu počeo je 1990-tih godina prošlog stoljeća. Dobiveni su različiti rezultati koji variraju s obzirom na primijenjenu metodu. Lignani na koje nisu vezani šećeri ekstrahiraju se enzimskom ili kiselinskom hidrolizom. Alkoholnom ekstrakcijom dobiveni su dobri rezultati, ali je potrebno duže vrijeme ekstrakcije. Osim toga, lignani ekstrahirani iz lanenog sjemena alkoholnom ekstrakcijom su dio kompleksnih polimernih struktura pa se ne mogu lako kvantificirati. Zbog toga, neophodno je provesti hidrolizu kako bi se pokidale esterske veze između glukozida lignana i 3-hidroksi-3-metil-glutarne kiseline i kako bi se na taj način oslobodio SDG iz kompleksnih struktura. Istraživanjima je utvrđeno da se alkalnom hidrolizom ekstrahira samo jedna vrsta lignana, tj. SDG. No primijeni li se kiselinska ili enzimska hidroliza, sastav dobivenog lanenog ekstrakta je drugačiji. Naime, osim SECO, kiselinskom hidrolizom su dobiveni matairezinol, pinoresinol, izolaricirezinol i demetoksi-sekoizolaricirezinol, dok su enzimskom hidrolizom dobiveni matairezinol, pinoresinol, izolaricirezinol, laricirezinol i demetoksi-sekoizolaricirezinol. U odnosu na kiselinsku i enzimsku hidrolizu, alkalna hidroliza se preferira za određivanje lignana u lanenom sjemenu (Nemes i Orsat, 2011).

O molekularnoj strukturi fenolnih tvari ovisi koja će se metoda primijeniti za njihovu ekstrakciju. Manje polarne komponente mogu se ekstrahirati pomoću heksana, dok se polarne komponente, poput SECO, ekstrahiraju polarnim otapalima, tj. metanolom ili etanolom. Učinkovita metoda za određivanje SDG je alkalna hidroliza pomoću natrijevog hidroksida (Herchi i sur., 2014).

2.7. EKSTRAKCIJA MIKROVALOVIMA

Mikrovalovi spadaju u toplo elektromagnetsko zračenje, odnosno to su valovi čija je valna duljina veća od valne duljine vidljive svjetlosti. Toplo elektromagnetsko zračenje posjeduje

određenu količinu energije koju predaje namirnici te se ona zagrijava. Stoga, djelovanjem toplog elektromagnetskog zračenja dolazi do direktnog zagrijavanja namirnice. Mikrovalovi su elektromagnetski valovi frekvencije od 100 MHz do nekoliko GHz (Herceg, 2009). Mikrovalovi, zajedno sa valovima kojima se prenose audio/video signali, infracrvenim zrakama i zrakama vidljive svjetlosti pripadaju u neionizirajuće zračenje. Karakteristike mikrovalova su da se odbijaju od metala, a prolaze kroz papir, staklo i plastiku (Blekić i sur., 2011).

Mikrovalovi se u prehrambenoj industriji ne koriste samo za pečenje, sušenje, zagrijavanje, odmrzavanje, blanširanje, dehidraciju, već i za druge operacije, kao što su pasterizacija i sterilizacija. Mikrovalovi ne uzrokuju promjene u strukturi tvari, već samo dolazi do porasta temperature zbog trenja, odnosno titranja molekula. Taj efekt je iskorišten u mikrovalnim pećnicama. Osim toga, mikrovalovi se mogu koristiti za inaktivaciju mikroorganizama, to je tzv. mikrovalna pasterizacija. No nedostatak mikrovalne pasterizacije je što može doći do nejednakog zagrijavanja (Blekić i sur., 2011).

U novije vrijeme razvijena je brza analitička metoda ekstrakcije koja koristi mikrovalove, tj. mikrovalna ekstrakcija. Mikrovalna ekstrakcija se, osim za analizu tragova organskih spojeva kod krutih uzoraka, primjenjuje za ekstrakciju prirodnih spojeva, kao što su fenolni spojevi. Mikrovalnom ekstrakcijom moguće je dobiti slične udjele ekstrahiranih tvari kao i standardnim metodama, ali uz puno kraće vrijeme, što je energetski i ekonomski isplativo. Nasuprot tome, primjenom mikrovalova može doći do povišenja temperature što može negativno utjecati na bioaktivne spojeve i kvalitetu ekstrahiranog materijala. Mikrovalna ekstrakcija se smatra potencijalnom alternativnom metodom tradicionalnoj kruto-tekućoj ekstrakciji za ekstrakciju metabolita iz biljaka. Mikrovalna ekstrakcija se koristi za ekstrakciju nutraceutika zbog smanjenja vremena ekstrakcije, smanjenja upotrebe otapala i poboljšanja ekstrakcijskog prinosa (Blekić i sur., 2011).

Upotreba dielektričnog zagrijavanja u laboratorijima koristeći mikrovalove započela je kasnih 70-tih godina prošlog stoljeća. Dielektrično zagrijavanje ovisi o sposobnosti materijala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu. Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka simultano i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks te na taj način potiče otapanje. Veličina čestica i raspodjela veličina imaju bitan utjecaj na učinkovitost mikrovalne ekstrakcije. Osim toga, u mikrovalnoj ekstrakciji jako je važan i izbor otapala. Izbor otapala ovisi o topljivosti željenog ekstrakta, o interakciji između otapala i matriksa te o svojstvima otapala, koja su određena dielektričnom konstantom, da upijaju energiju mikrovalova. Izabrano otapalo trebalo bi imati visoku dielektričnu konstantu i mogućnost dobrog upijanja energije mikrovalova. Etanol,

metanol i voda su pogodna otapala, jer su dovoljno polarna da bi se mogli zagrijati mikrovalnom energijom. Još jedan važan faktor za mikrovalnu ekstrakciju je temperatura. Općenito, povišenje temperature rezultira boljim ekstrakcijskim učinkom. Izabrana snaga mikrovalova tijekom mikrovalne ekstrakcije mora biti pravilno postavljena kako bi se izbjeglo prekoračenje temperature, što dovodi do razgradnje termoosjetljivih tvari (Blekić i sur., 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

U ovom radu je korištena lanena pogača, koja je proizvedena hladnim prešanjem u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta iz sjemenki lana uzgojenih 2016. godine u okolini Zagreba na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kod proizvodnje ulja korištene su smeđe sorte Petrovac, Niagara, Međimurje, Altess te Biltstar u jednakim omjerima. Dobivena pogača samljevena je i skladištena u hladnjaku na -20° C.

3.1.2. Reagensi i standardi

U radu su se za istraživanje koristili:

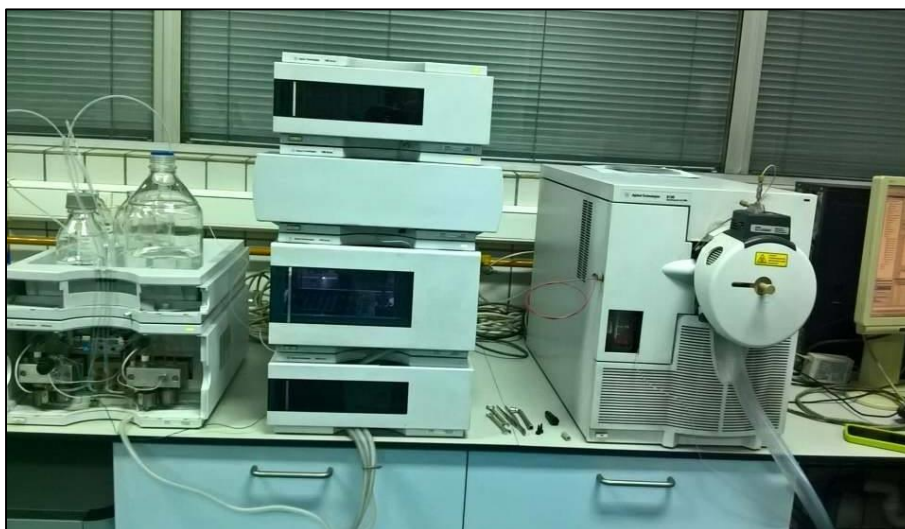
- metanol,
- HPLC metanol,
- demineralizirana voda,
- natrij hidroksid,
- mravlja kiselina,
- petroleter,
- octena kiselina,
- natrij acetatni pufer,
- sekoizolaricirezinol diglukoizd (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD),
- SPE Kolone s C-8 punjenjem (Varian, Bond Elut – Certify II, 50 mg, 3 mL).

3.1.3. Aparatura

- aparatura po Soxhletu (INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska) (slika 6),
- magnetska mješalica IKA, C-MAG HS7 s termoregulatorom IKA, ETS-D5, Staufen im Breisgau, Njemačka,
- laboratorijska pužna preša „Komet“, model CA/53 (Monforts & Reiners, Rheydt, Njemačka),
- rotavapor (Heidolph, Schwabach, Njemačka),
- uparivač s dušikom, Reacti-Therm Dry Block + Reacti-Vap Evaporator (Pierce, SAD),
- mikrovalno-ultrazvučni ekstraktor/reaktor (Lab Kits, Hong Kong, Kina),
- centrifuga (Falcon, Colorado, SAD),
- HPLC sustav sa binarnom pumpom, autosemplerom, DAD detektorom 1200 Series, Agilent Technologies (Santa Clara, SAD) (slika 7),
- ultrazvučna kupelj (Sonorex, Belin, Njemačka).



Slika 6. Aparatura po Soxhletu (vlastita fotografija)



Slika 7. HPLC sustav (vlastita fotografija)

3.2. METODE RADA

3.2.1. Određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u lanenom sjemenu i pogači

U ovom radu je za određivanje vode u lanenom sjemenu i pogači korištena standardna metoda (HRN EN ISO 665:2004) sušenje do konstantne mase u sušioniku pri temperaturi od $103 \pm 2^\circ\text{C}$. Sjeme lana analiziralo se bez prethodnog mljevenja.

U osušenu i izvaganu posudicu izvaže se na analitičkoj vagi 5 g sjemena/pogače s točnošću 0,001 g. Posudica se s podignutim poklopcem stavi u sušionik koji je prethodno zagrijan na $103 \pm 2^\circ\text{C}$. Nakon 2 sata posudica se u sušioniku zatvori poklopcem i stavi hladiti u eksikator. Kada se ohladi do sobne temperature, izvaže se i ponovo stavi s podignutim poklopcem u sušionik 1 sat. Nakon toga se ponovo hladi i važe. Sušenje se nastavlja po 1 sat dok razlika u masi između dva uzastopna mjerenja ne iznosi više od 0,005 g. Za svaki uzorak naprave se dva paralelna određivanja, među kojima razlika ne smije biti veća od 0,5%. Kao rezultat uzima se srednja vrijednost dva paralelna određivanja.

Udio vode izražava se u postocima prema jednadžbi [1],

$$\% \text{ vode} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad [1]$$

gdje je:

m_0 – masa prazne posudice (g)

m_1 – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_2 – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

3.2.2. Određivanje udjela ulja u lanenom sjemenu i pogači

Za određivanje ulja u lanenom sjemenu i pogači u ovom radu korištena je standardna metoda (HRN EN ISO 659:2010).

U tuljcu za ekstrakciju izvaže se 5-10 g očišćenog i samljevenog sjemena lana/pogače. Sjeme lana samljeveno je u električnom mlinu za kavu. Tuljac s uzorkom zatvori se vatom i stavi se u aparaturu za ekstrakciju po Soxhletu. Doda se potreban volumen otapala petroletera te se ekstrakt sakuplja u izvaganu tikvicu u koju su stavljene 2-3 kuglice za vrenje. Ekstrakcija se provodi 8 sati. Nakon završene ekstrakcije otapalo se otpari, a ostatak se suši 60 minuta pri $103 \pm 2^\circ\text{C}$, ohladi i važe. Sušenje se nastavlja po 30 minuta do konstantne mase. Rezultati se izražavaju kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja, među kojima razlika ne prelazi 0,5%, a izražavaju se jednu decimalu.

Maseni udio ulja izračuna se prema jednadžbi [2],

$$\% \text{ ulja} = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100 \quad [2]$$

gdje je:

m_0 – masa uzorka sjemena (g)

m_1 – ukupna masa ekstrahiranog ulja (g)

3.2.3. Proizvodnja ulja

Kod proizvodnje ulja korištene su smeđe sorte Petrovac, Niagara, Međimurje, Altess, D. Stanković te Biltstar u jednakim omjerima. Laneno sjeme se najprije samelje u električnom mlinu na odgovarajuću veličinu pogodnu za prešanje, a količina vlage se podesi dodatkom vode, na približno 9,5%. Tako pripremljeno sjeme se ručno usipava kroz lijevak preše. Okretanjem puža preše dolazi do prešanja i izdvajanja ulja iz sjemena. Da se postigne bolje iskorištenje regulira se tlak na izlaznom otvoru za pogaču pomoću diyni. Izdvojeno ulje skuplja se u odgovarajuću, prethodno pripremljenu posudu, dok se pogača usitnjava i ponovno preša, kako bi se postiglo bolje iskorištenje. Nakon drugog prešanja pogača se samelje u električnom mlinu te se čuva na -20°C radi daljnjih analiza.

3.2.4. Iskorištenje procesa proizvodnje ulja

Za određivanje iskorištenja procesa proizvodnje ulja iz lanenog sjemena, potrebno je odrediti udio vode i ulja u dobivenoj pogači. Navedeni parametri određeni su metodama opisanim u podpoglavljima 3.2.1. Određivanje udjela vode i hlapljivih tvari u lanenom sjemenu i pogači i 3.2.2. Određivanje udjela ulja u lanenom sjemenu i pogači

Iskorištenje procesa definirano je kao omjer stvarne mase ulja proizvedenog iz 100 g sjemena i udjela ulja u sjemenu, a izražava se u postocima (%). Iskorištenje procesa proizvodnje ulja izračunava se prema jednadžbama [3] i [4],

$$m_u = u_s - \frac{u_p \cdot (100 - v_s - u_s)}{100 - v_p - u_p} \quad [3]$$

$$\text{Iskorištenje procesa (\%)} = \frac{m_u}{u_s} \cdot 100 \quad [4]$$

gdje je:

m_u – masa dobivenog ulja

u_s – udio ulja u lanenom sjemenu (g)

u_p – udio ulja u pogači (g)

v_s – udio vode u lanenom sjemenu (g)

v_p – udio vode u pogači (g)

3.2.5. Referentna metoda ekstrakcije lignana

Kao referentna metoda korišten je postupak objavljen od Čukelj i suradnika (2011). U kivete se izvaže 0,05 g lanene pogače i doda 5 mL otapala za ekstrakciju koji se sastoji od 70% metanola i 30% 0,3 M NaOH. NaOH se dodaje kako bi došlo do bazne hidrolize, odnosno kako bi došlo do pucanja esterskih veza unutar makromolekula. Tako pripremljen uzorak miješa se 60 minuta u vodenoj kupelji, pri temperaturi 60°C. Nakon 60 minuta kivete se hlade pod mlazom vode. Ohlađeni uzorak se centrifugira 10 minuta pri 2500 okretaja min⁻¹. Dobiveni supernatant, koji sadrži lignane i fenolne kiseline odvoji se u tikvicu s okruglim dnom. Postupak ekstrakcije fenolnih spojeva ponavlja se još 8 puta. Dobiveni ekstrakti se spoje u odmjernu tikvicu od 100 ml i nadopune otapalom do oznake.

Uzorak iz tikvice s okruglim dnom se pomoću šprice profiltrira kroz PVDF filter veličine pora 0,2 µm u vijalicu. Pripremljeni ekstrakt služi za određivanje lignana na HPLC sustavu.

3.2.6. Ekstrakcija lignana i fenolnih spojeva na tresilici

U Erlenmeyerove tikvice odvaži se 1 g, 2 g, 3 g, odnosno 5 g lanene pogače po 2 probe. U prvu probu doda se 100 mL otapala, koje se sastoji od 70% metanola i 30% 0,1 M NaOH, dok se u drugu probu doda 100 mL otapala, koje se sastoji od 70% metanola i 30% 0,3 M NaOH. Erlenmeyerove tikvice začepi se vatom i obloži parafilmom. Tako pripremljene tikvice stave se na tresilicu 5 sati, na 25°C, pri 150 okretaja min⁻¹. Nakon 5 sati ekstrakcije ekstrakt se odvoji od pogače centrifugiranjem 5 minuta, pri 5000 okretaja min⁻¹. Zatim se supernatant prebaci u odmjernu tikvicu od 100 mL. Odmjerne tikvice nadopune se odgovarajućim otapalom do oznake. Alikvot iz odmjerne tikvice se pomoću šprice profiltrira u vijalicu kroz PVDF filter. Pripremljeni ekstrakti služe za određivanje lignana i fenolnih spojeva na HPLC sustavu.

3.2.7. Ekstrakcija lignana i fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru/reaktoru

U Erlenmeyerovu tikvicu s metalnim produžetkom za prijenos ultrazvučnih valova doda se 5 g lanene pogače i 100 mL otapala za ekstrakciju. Kao otapalo za ekstrakciju korištena je smjesa 70% metanola i 30% 0,1 M NaOH te smjesa 70% metanola i 30% 0,3 M NaOH. Tikvica s uzorkom stavi se u uređaj za ultrazvučno-mikrovalnu ekstrakciju te se podesi odgovarajuća snaga i vrijeme. Raspon snage koji se koristio bio je od 100 do 300 W, a vrijeme od 3 do 9 minuta. Nakon provedene ekstrakcije uzorak se stavi centrifugirati 15 minuta na 5000 okretaja min⁻¹, kako bi se fenolni ekstrakt odvojio od lanene pogače. Supernatant se prebaci u odmjernu tikvicu od 100 mL te se nadopuni otapalom do oznake. Alikvot iz odmjerne tikvice se pomoću šprice profiltrira u vijalicu kroz PVDF filter veličine pora 0,2 µm. Pripremljeni ekstrakti služe za određivanje lignana na HPLC sustavu.

3.2.8. Plan pokusa za ekstrakciju fenolnih spojeva na ultrazvučno-mikrovalnom ekstraktoru/reaktoru

Plan pokusa izrađen je na temelju prijašnjih radova Beejmohun i sur. (2007). U tablici 5 i tablici 6 prikazan je plan i redoslijed pokusa.

Tablica 5. Plan pokusa (Šarža 1 - mikrovalna ekstrakcija 70% metanol + 30% 0,1 M NaOH)

Redni broj pokusa	Snaga mikrovalova (W)	Vrijeme (min)
1	100	3
2	100	6
3	100	9
4	200	3
5	200	6
6	200	9
7	300	3
8	300	6
9	300	9

Tablica 6. Plan pokusa (Šarža 2 - mikrovalna ekstrakcija 70% metanol + 30% 0,3 M NaOH)

Redni broj pokusa	Snaga mikrovalova (W)	Vrijeme (min)
1	100	3
2	100	6
3	100	9
4	200	3
5	200	6
6	200	9
7	300	3
8	300	6
9	300	9

3.2.9. Određivanje sastava lignana i fenolnih spojeva lanene pogače

Sastav lignana i fenolnih spojeva lanene pogače određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, tzv. HPLC sustav pomoću Agilent Technologies HPLC serije 1200 s DAD detektorom. Razdvajanje lignana ekstrahiranih iz lanene pogače provedeno je pri 30°C na Phenomenex C18 nepolarnoj koloni (Kinetex 150 mm × 4,6 mm, 2,6 μm, 100 Å). Količina injektiranog uzorka iznosila je 5 μL. Kao mobilna faza korištene su 0,1% otopina mravlje

kiseline u vodi (mobilna faza A) i 0,1% otopina mravlje kiseline u metanolu (mobilna faza B). Protok otapala bio je $0,9 \text{ mL min}^{-1}$.

Kromatogrami fenolnih spojeva snimljeni su na 280 i 330 nm, a kroz cijelo vrijeme trajanja analize snimani su spektri u ultraljubičastom području, od 200 do 400 nm. Fenolni spojevi lanene pogače identificirani su usporedbom spektra i retencijskih vremena detektiranih spojeva i standarda (*p*-kumarinska, *o*-kumarinska i ferulinska kiselina). Za identifikaciju lignana lanene pogače injektirani su standardi lignana (pinorezinol i sekoizolaricirezinol diglukoizd).

Za određivanje fenolnih spojeva korištena je metoda razvijena u diplomskom radu Cvitanić (2016).

Protok otapala: $0,9 \text{ mL min}^{-1}$
Temperatura kolone: 30°C
Količina injektiranog uzorka: $5 \mu\text{L}$
Gradijent: programiran (tablica 7)
 A: 0,1% mravlja kiselina u vodi
 B: 0,1% mravlja kiselina u metanolu

Koncentracija SDG-a (mg g^{-1}) računa se prema jednadžbi [5] dobivenoj iz baždarne krivulje:

$$y = 1,8961x + 9,6003 \quad [5]$$

gdje je:

y = površina ispod pika

x = koncentracija SDG-a (mg g^{-1})

Ista formula korištena je za računanje koncentracije glukozida *p*-kumarinske i ferulinske kiseline.

Koncentracija pojedinačnih lignana i fenola u pogači (mg kg^{-1}) računa se prema jednadžbi [6]:

$$c(\text{fenol}_i) = \frac{x_i \cdot 100}{m} \quad [6]$$

gdje je:

x_i = koncentracija (SDG, glukozida fenolnih kiselina) (mg g^{-1})

m = masa uzorka uzetog za analizu

Tablica 7. Prikaz promjene gradijenta otapala u ovisnosti o vremenu

Vrijeme (min)	Volumni udio otopine A (%)	Volumni udio otopine B (%)
0	90	10
3	90	10
15	50	50
20	40	60
25	0	100
26	0	100
26,1	90	10
28	90	10

3.2.10. Statistika

Za statističku analizu i izradu grafičkih prikaza eksperimentalnih podataka korišteni su Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD) i Microsoft Office Excel 2007. Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom, a za usporedbu uzoraka korišten je ANOVA test. Kao granica statističke značajnosti postavljena je vrijednost za $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedene su analize na lanenom sjemenu uzgojenom u okolini grada Zagreba na eksperimentalnom polju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2016. godine. Dobiveni rezultati prikazani su tabličnim i grafičkim prikazima. Cilj ovog rada bio je uhodati proces ekstrakcije i detekcije lignana i fenolnih kiselina iz lanene pogače koristeći postojeće metode te ispitati utjecaj mikrovalova na ekstraktibilnost bioaktivnih spojeva. Budući da je problem referentnih metoda dugotrajna ekstrakcija, željelo se ispitati da li je mikrovalnom ekstrakcijom moguće dobiti slične udjele ekstrahiranih tvari kao i standardnim metodama, ali uz puno kraće vrijeme, što bi ujedno bilo energetski i ekonomski isplativo (Beejmohun i sur., 2007; Nemes i Orsat, 2012).

4.1. KVALITETA LANENOG SJEMENA I POGAČE

S ciljem utvrđivanja kvalitete lanenog sjemena i pogače provedene su analize udjela vode i udjela ulja u lanenom sjemenu, odnosno pogači. Dobiveni rezultati izraženi su u postocima, kao srednja vrijednost dva paralelna određivanja. Za određivanje vode u lanenom sjemenu i pogači korištena je standardna metoda sušenje do konstantne mase, a za određivanje ulja korištena je standardna metoda po Soxhletu.

Udio vode u sjemenu ovisi o stupnju zrelosti sjemena, vremenskim prilikama tijekom sazrijevanja i žetve, a tijekom skladištenja vrlo je važna relativna vlažnost zraka, kako suho sjeme ne bi apsorbiralo vodu iz zraka. Povećanjem vlažnosti sjemena dolazi do biokemijskih promjena u sjemenu pa dolazi do klijanja, razgradnje triacilglicerola, razvoja plijesni i drugih mikroorganizama, a samim time se umanjuje kakvoća sjemena i povećavaju troškovi jer takvo sjeme prije skladištenja i prerade treba sušiti (Rade i sur., 2001).

Udio ulja jedan je od parametara za procjenu kakvoće sjemena. Na udio ulja utječu klimatski faktori, naročito temperatura, koja negativno korelira sa udjelom ulja, te kiša, koja pozitivno korelira sa sadržajem ulja. Geografska širina, genotip (Kumar i sur., 2006) te vlažnost i temperatura tijekom skladištenja, kao i duljina skladištenja također su važni parametri o kojima ovisi udio ulja u sjemenu (Šimić i sur., 2007).

U tablici 8 prikazani su rezultati udjela vode i ulja u lanenom sjemenu. Uzorak lanenog sjemena činile su smeđe sorte Petrovac, Niagara, Međimurje, Altess, D. Stanković te Biltstar u jednakim omjerima.

Tablica 8. Udio vode i ulja u lanenom sjemenu i pogači

Uzorak	Udio vode (%)	Udio ulja na suhu tvar (%)
Laneno sjeme	6,63	36,3
Pogača	9,64	10,3

Udio vode u lanenom sjemenu je 6,63% što se slaže s literaturnim podacima objavljenim u radu Rade i sur. (2001), koji navode udio vode u lanenom sjemenu od 6% do 8%.

Laneno sjeme sadrži sličan udio vode s obzirom na ostale uljarice, poput suncokreta, koji ima od 6% do 8% vode (Litvischenko i sur., 2017) te uljane repice, koja ima od 5% do 9% vode (Siger i Józefiak, 2016). Druge sirovine koje se koriste za proizvodnju ulja imaju veći udio vode, kao npr. soja, koja ima oko 13% vode (Poeta i sur., 2014), buče, koja ima više od 25% vode (Uddin i sur., 2016) te masline, koja ima od 50% do 60% vode (van Doosselaere, 2013). Udio ulja na suhu tvar u lanenom sjemenu iznosi 36,3% što se slaže s literaturnim podacima objavljenim u radu Rade i sur. (2001), koji navode udio ulja u lanenom sjemenu od 33% do 43%. Pali i Mehta (2014) navode udio ulja od 34,0% do 42,4%. To ukazuje da je sjeme dobre kvalitete i da su dobiveni rezultati u skladu s navedenim istraživanjima.

Laneno sjeme ima sličan udio ulja s obzirom na ostale uljarice, kao npr. suncokret, koji ima od 38% do 48% ulja (Grunvald i sur., 2014), uljana repica od 38% do 50% (Koubaa i sur., 2016), dok buča sadrži čak 40-54% ulja (Procida i sur., 2013). Laneno sjeme ima veći udio ulja s obzirom na maslinu, koja ima oko 20% do 25% ulja, kako navodi van Doosselaere (2013) te soju, koja ima oko 18% ulja (Poeta i sur., 2014).

Rezultati udjela vode i ulja u pogači prikazani su također u tablici 8. Lanena pogača dobivena je kao nusprodukt pri proizvodnji lanenog ulja hladnim prešanjem. Kod proizvodnje ulja korištene su smeđe sorte Petrovac, Niagara, Međimurje, Altess, D. Stanković te Biltstar u jednakim omjerima.

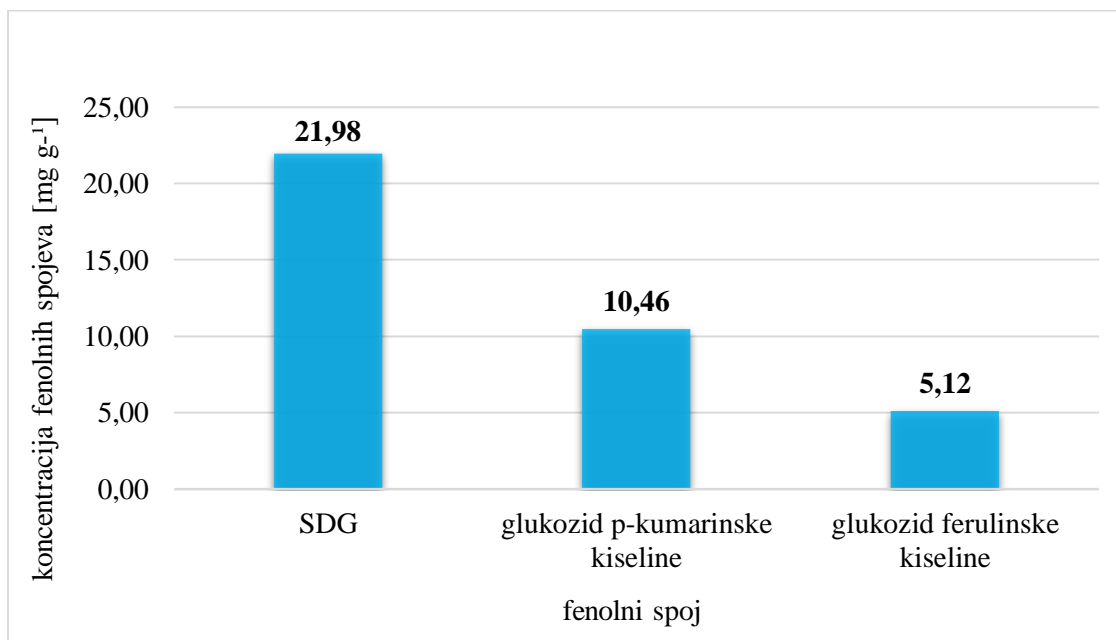
Udio vode u pogači je 9,64%, dok udio ulja na suhu tvar iznosi 10,3%. Gutiérrez i sur. (2010) u svom radu navode da je udio vode za pogaču 10,65%, dok je udio ulja na suhu tvar 29,37%. Mueller i sur. (2010) su u svom istraživanju, za pogaču od smeđih sorti, naveli udio vode oko 12,6%, a udio ulja oko 12,4%, što znači da je iskorištenje procesa kojeg su koristili manje. Dakle, udio vode i ulja u pogači se razlikuje, što ovisi o upotrijebljenim različitim sortama lana te primijenjenom procesu proizvodnje ulja.

4.2. ISKORIŠTENJE PROCESA PROIZVODNJE ULJA

Iskorištenje procesa proizvodnje ulja izračunato je pomoću jednadžbe opisane u podpoglavlju 3.2.4. Iskorištenje procesa proizvodnje ulja u ovom radu iznosi 79,85%. U istraživanju kojeg su proveli Gui i sur. (2012) iskorištenje procesa proizvodnje ulja iznosi 34,6%, što je znatno manje od iskorištenja dobivenog u ovom radu. Razlog tome može biti što je u ovom istraživanju podešeni udio vlage u sjemenu te je prešanje pogače provedeno dva puta. Dakle, podešavanjem udjela vlage u sjemenu i ponovnim prešanjem pogače postiže se veće iskorištenje.

4.3. EKSTRAKCIJA LIGNANA REFERENTNOM METODOM

Kao referentna metoda za određivanje fenolnih spojeva iz lanene pogače korišten je postupak objavljen od Čukelj i suradnici (2011) s ciljem da se odredi koncentracija lignana i drugih fenolnih spojeva u pogači, koja će biti korištena u daljnjim istraživanjima. Koncentracije SDG-a, glukozida *p*-kumarinske kiseline te glukozida ferulinske kiseline jedini su detektirani spojevi i prikazani su grafički (slika 8).



Slika 8. Koncentracija fenolnih spojeva ekstrahiranih referentnom metodom

Dominantni spoj lanene pogače je SDG, čija je koncentracija $21,98 \text{ mg g}^{-1}$, zatim slijedi glukozid *p*-kumarinske kiseline s $10,46 \text{ mg g}^{-1}$, dok koncentracija glukozida ferulinske kiseline iznosi $5,12 \text{ mg g}^{-1}$.

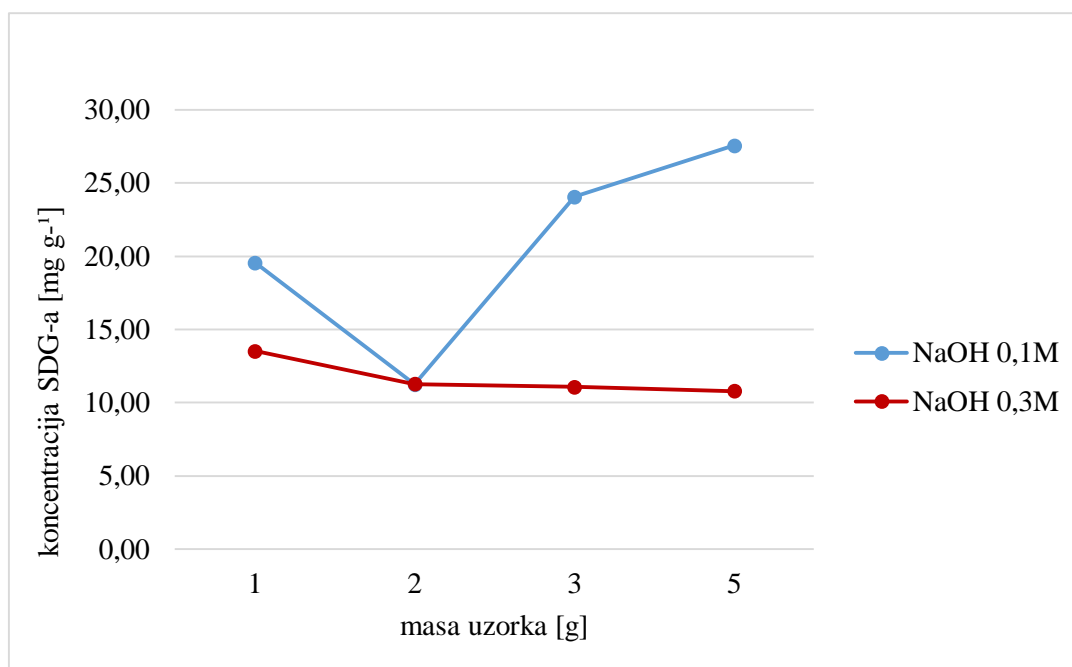
U istraživanju Eliasson i sur. (2003) prilikom direktne alkalne hidrolize s 1 M NaOH postignuta je koncentracija SDG-a od $11,9 \text{ mg g}^{-1}$ do $25,9 \text{ mg g}^{-1}$, ovisno o sorti lana. Stoga, osim vrste otapala, vrlo bitan utjecaj na koncentraciju SDG-a ima sorta lana koja se ispituje.

Koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline u istom istraživanju iznosi od $1,2 \text{ mg g}^{-1}$ do $8,5 \text{ mg g}^{-1}$, ovisno o sorti lana, što je manje od koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline ($10,46 \text{ mg g}^{-1}$) postignute u ovom radu.

U istraživanju Eliasson i sur. (2003) postignuta je koncentracija glukozida ferulinske kiseline od $1,6 \text{ mg g}^{-1}$ do $5,0 \text{ mg g}^{-1}$, ovisno o sorti lana, što je manje od koncentracije glukozida ferulinske kiseline ($5,12 \text{ mg g}^{-1}$) postignute u ovom radu.

4.4. EKSTRAKCIJA NA TRESILICI

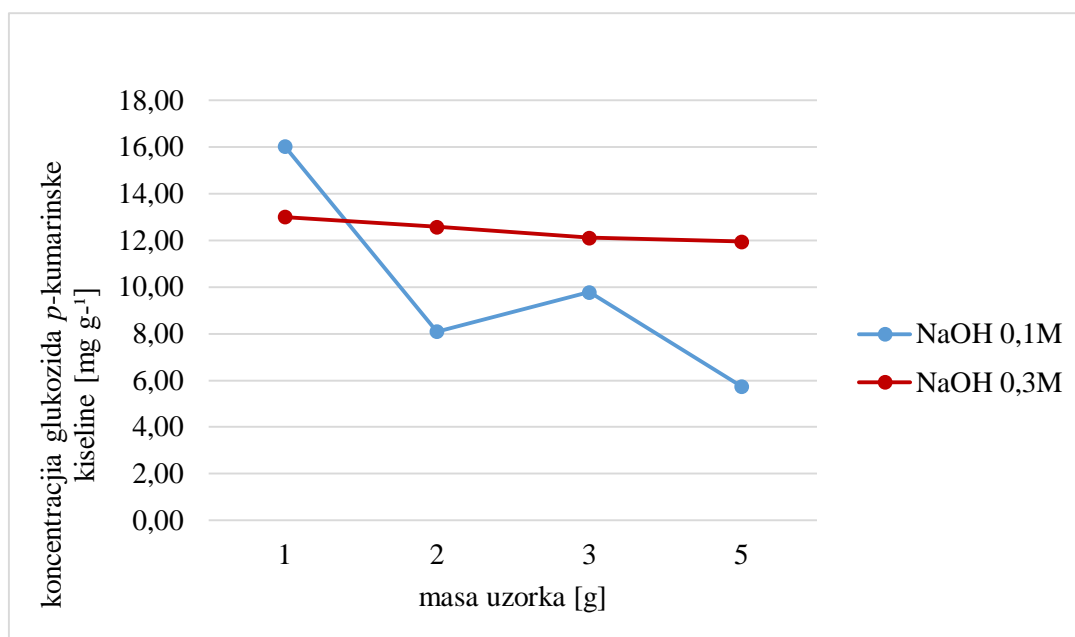
Ekstrakcija na tresilici u trajanju od 5 sati, na 25°C , pri $150 \text{ okretaja min}^{-1}$ provedena je s ciljem da se odredi optimalna masa pogače te koncentracija otapala, koji će biti korišteni u daljnjim ekstrakcijama. Za istraživanje je korišteno od 1 g do 5 g lanene pogače otopljeno u 100 ml 2 različita otapala. Za prvu probu korišteno je otapalo, koje se sastoji od 70% metanola i 30% $0,1 \text{ M NaOH}$, dok je za drugu probu korišteno otapalo, koje se sastoji od 70% metanola i 30% $0,3 \text{ M NaOH}$. Nakon ekstrakcije analizirane su koncentracije SDG-a, glukozida *p*-kumarinske kiseline te glukozida ferulinske kiseline, a dobiveni rezultati prikazani su grafičkim prikazima.



Slika 9. Ovisnost udjela SDG-a o masi uzorka s dvije različite molarne koncentracije NaOH

Na slici 9 prikazana je ovisnost koncentracije SDG-a o masi uzorka s 0,1 M NaOH te 0,3 M NaOH. Ekstrakcija SDG-a, neovisno o masi uzorka, učinkovitija je s 0,1 M NaOH. Naime, kod svih korištenih masa uzorka, osim kod mase uzorka 2 g, koncentracija SDG-a veća je ako se upotrebljava otapalo koje se sastoji od 70% metanola i 30% 0,1 M NaOH. Porastom mase uzorka raste koncentracija SDG-a, ako se primijeni otapalo s 0,1 M NaOH, dok se, nasuprot tome, porastom mase uzorka neznatno smanjuje koncentracija SDG-a prilikom ekstrakcije s 0,3 M NaOH. Najveća koncentracija SDG-a postignuta je kod mase uzorka 5 g te s 0,1 M NaOH, a iznosi 27,56 mg g⁻¹. Koristeći 0,3 M NaOH postignuta je najveća koncentracija SDG-a kod mase uzorka 1 g te iznosi 13,52 mg g⁻¹.

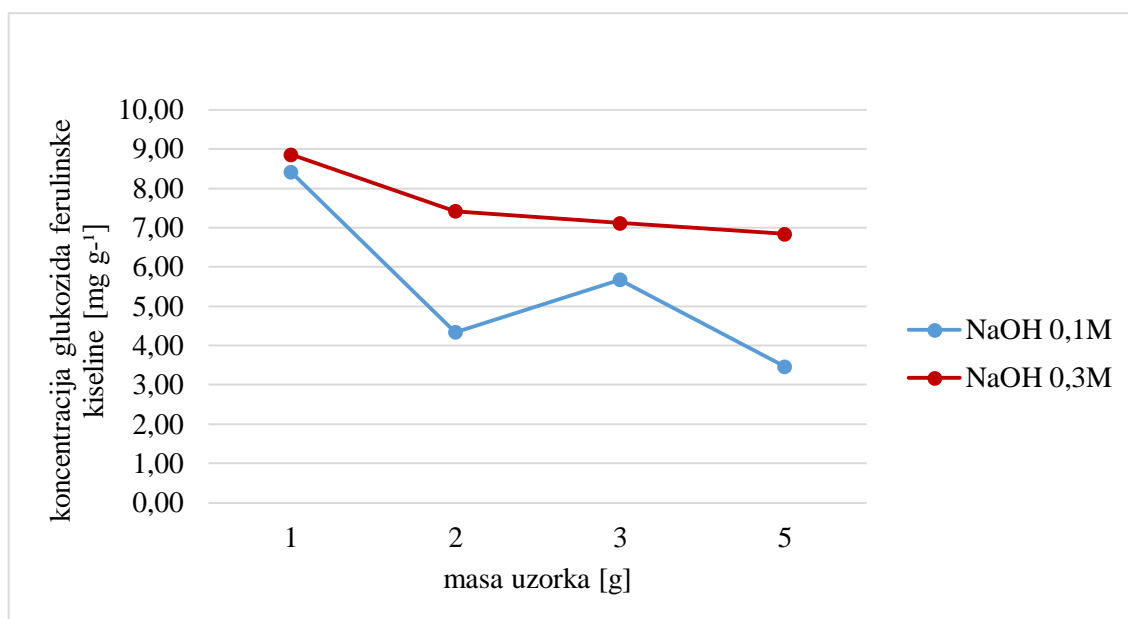
U istraživanju Hano i sur. (2006) prilikom ekstrakcije sa 70% metanolom i 0,1 M NaOH postignuta je koncentracija SDG-a 14,0 mg g⁻¹. U istraživanju Beejmohun i sur. (2007) prilikom ekstrakcije sa 70% metanolom i 0,1 M NaOH postignuta je koncentracija SDG-a $12,7 \pm 0,8$ mg g⁻¹. U navedenim istraživanjima koncentracije SDG-a manje su od koncentracije SDG-a postignute u ovom istraživanju (27,56 mg g⁻¹). Prilikom ekstrakcije sa 70 % metanolom i 1 M NaOH u istraživanju Beejmohun i sur. (2007) postignuta je koncentracija SDG-a $12,8 \pm 0,1$ mg g⁻¹, dok je u ovom istraživanju prilikom ekstrakcije sa 70% metanolom i 0,3 M NaOH postignuta koncentracija SDG-a veća (13,52 mg g⁻¹).



Slika 10. Ovisnost udjela glukozida *p*-kumarinske kiseline o masi uzorka s dvije različite molarne koncentracije NaOH

Slika 10 prikazuje ovisnost koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline kod mase uzorka 1 g, 2 g, 3 g i 5 g te 0,1 M NaOH i 0,3 M NaOH. Kod svih upotrijebljenih masa, osim kod mase uzorka 1 g, ekstrakcija glukozida *p*-kumarinske kiseline učinkovitija je, ako se upotrebljava otapalo koje se sastoji od 70% metanola i 30% 0,3 M NaOH. Porastom mase uzorka smanjuje se koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline kod oba molariteta NaOH. Najveća koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline postignuta je kod mase uzorka 1 g s 0,1 M NaOH, a iznosi 16,04 mg g⁻¹. Također, prilikom ekstrakcije s 0,3 M NaOH, najveća koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline postignuta je kod mase uzorka 1 g te iznosi 13,01 mg g⁻¹.

U istraživanju Beejmohun i sur. (2007) prilikom ekstrakcije sa 70% metanolom i 0,1 M NaOH postignuta je koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline $2,2 \pm 0,1$ mg g⁻¹, dok je prilikom ekstrakcije sa 70% metanolom i 0,3 M NaOH postignuta koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline $3,4 \pm 0,1$ mg g⁻¹. Dakle, u navedenom istraživanju koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline manje su u odnosu na koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline postignute u ovom istraživanju, neovisno o primijenjenom otapalu.



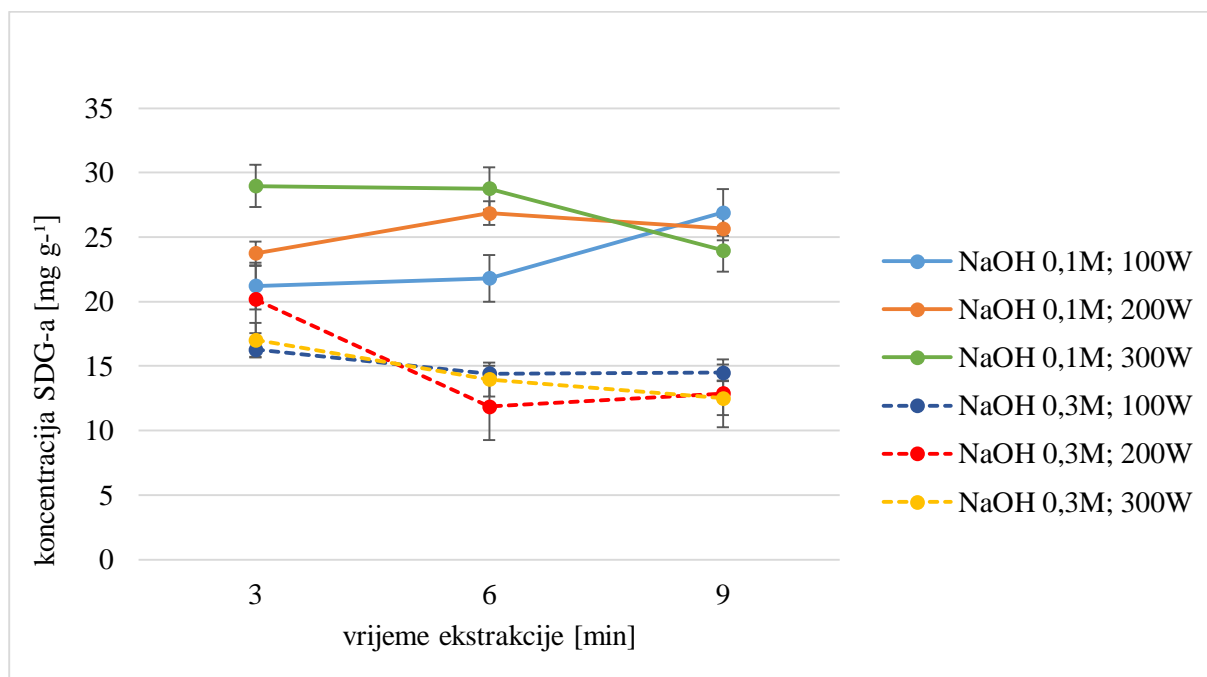
Slika 11. Ovisnost koncentracije glukozida ferulinske kiseline o masi uzorka s dvije različite molarne koncentracije NaOH

Na slici 11 je prikazana ovisnost koncentracije glukozida ferulinske kiseline o masi uzorka s 0,1 M NaOH i 0,3 M NaOH. Učinkovitija ekstrakcija glukozida ferulinske kiseline postiže se s 0,3 M NaOH. Naime, kod svih upotrijebljenih masa uzorka postignute su veće koncentracije glukozida ferulinske kiseline, ako se koristi 0,3 M NaOH u odnosu na 0,1 M NaOH. Porastom mase uzorka smanjuje se koncentracija glukozida ferulinske kiseline, kod oba primijenjena molariteta NaOH. Najveća koncentracija glukozida ferulinske kiseline postignuta je kod mase uzorka 1 g s 0,3 M NaOH, a iznosi $8,86 \text{ mg g}^{-1}$. Što se tiče ekstrakcije s 0,1 M NaOH, najveća koncentracija glukozida ferulinske kiseline postiže se također kod mase uzorka 1 g te iznosi $8,42 \text{ mg g}^{-1}$. U istraživanju Beejmohun i sur. (2007) prilikom ekstrakcije sa 70% metanolom i 0,1 M NaOH dobivena je udio glukozida ferulinske kiseline $2,1 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$, dok je prilikom ekstrakcije sa 70% metanolom i 0,3 M NaOH postignuta koncentracija glukozida ferulinske kiseline $3,2 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$. U navedenom istraživanju koncentracije glukozida ferulinske kiseline, neovisno o primijenjenom otapalu manje su u odnosu na koncentracije glukozida ferulinske kiseline postignute u ovom istraživanju.

S obzirom na različite rezultate ovisno o molarnoj koncentraciji NaOH kod lignana i glukozida fenolnih kiselina za daljnje istraživanje uzeta su otapala i s 0,1 i 0,3 M NaOH. Fokus istraživanja stavljen je na ekstrakciju SDG-a kao najzastupljenijeg fenolnog spoja u pogači lana i stoga je za daljna istraživanja odbrana masa uzorka od 5 g, tj omjer pogača:otapalo 1:20.

4.5. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA

Ultrazvučno-mikrovalni ekstraktor je višenamjenski aparat koji daje mogućnost tri načina rada, ultrazvučno, mikrovalno i kombinirano ultrazvučno-mikrovalno. U ovom radu upotrijebljena je ekstrakcija pomoću mikrovalova. Korištena su otapala različite molarne koncentracije NaOH, primijenjena je različita snaga mikrovalova i različito vrijeme ekstrakcije. Na temelju preliminarnih istraživanja kao otapalo za ekstrakciju korištena je smjesa 70% metanola i 30% 0,1 M NaOH te smjesa 70% metanola i 30% 0,3 M NaOH. Raspon snage koji se koristio bio je od 100 do 300 W, a vrijeme od 3 do 9 minuta. Slični parametri korišteni su u prijašnjim istraživanjima ekstrakcije fenolnih spojeva mikrovalovima iz pogače lana (Beejmohun i sur., 2007; Nemes i Orsat, 2011) te komine masline (Cvitanić, 2016). Nakon ekstrakcije analizirane su koncentracije SDG-a, glukozida *p*-kumarinske kiseline te glukozida ferulinske kiseline, a dobiveni rezultati prikazani su grafičkim prikazima. Statističkom analizom uspoređivani su utjecaji vremena, molarne koncentracije i snage mikrovalova ekstrakcije na koncentraciju pojedinog detektiranog spoja. Statistički značajni odnosi prikazani su grafički ($p \leq 0,05$).

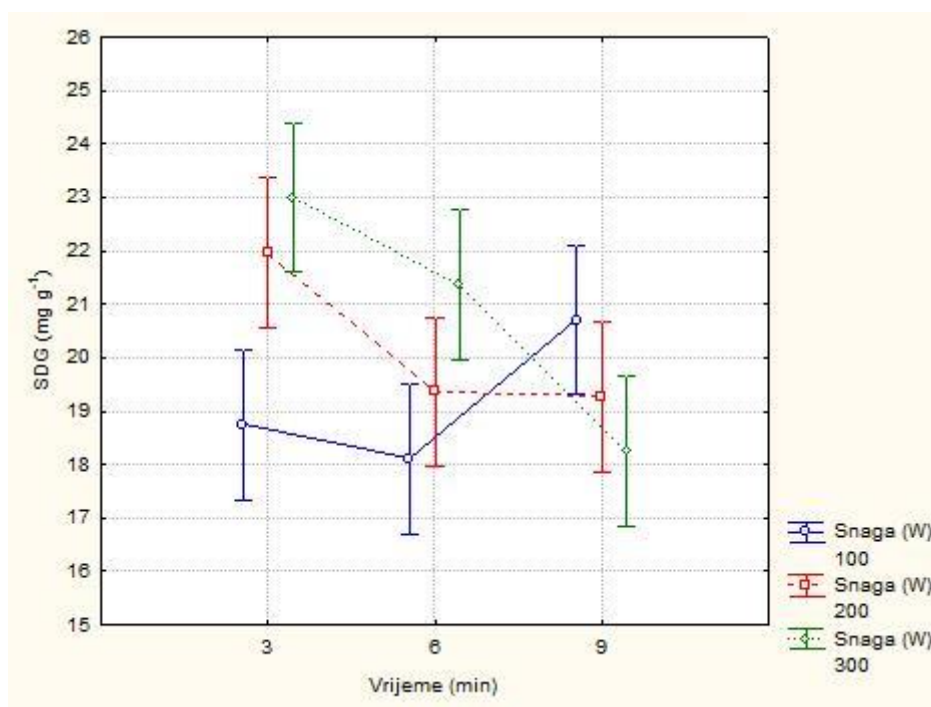


Slika 12. Ovisnost koncentracije SDG-a o vremenu ekstrakcije kod tri različite snage mikrovalova s dvije različite molarne koncentracije NaOH

Slika 12 prikazuje ovisnost koncentracije SDG-a o vremenu ekstrakcije kod tri različite snage mikrovalova (100 W, 200 W i 300 W) s dva različita molariteta NaOH (0,1 M NaOH i 0,3 M

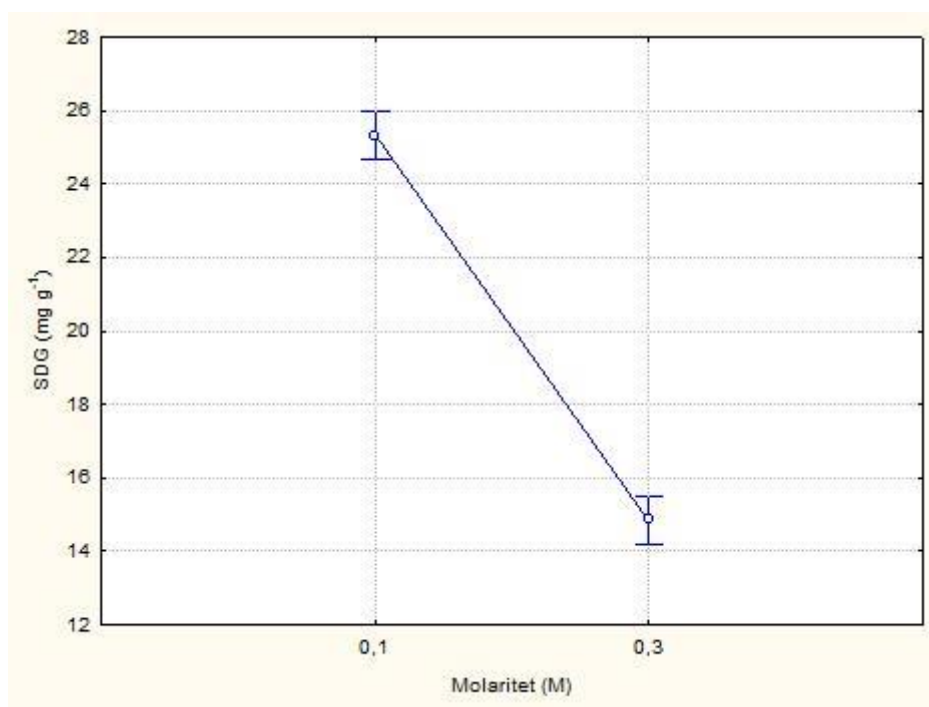
NaOH). Za ekstrakciju SDG-a učinkovitije je otapalo s 0,1 M NaOH, budući da su koncentracije SDG-a ekstrahiranog s 0,1 M NaOH više kod svih upotrijebljenih snaga mikrovalova i različitih vremena. Najviša koncentracija SDG-a postignuta je s 0,1 M NaOH kod 300 W i nakon 3 minute ekstrakcije ($28,96 \text{ mg g}^{-1}$), a odmah zatim slijedi koncentracija SDG-a ekstrahiranog s 0,1 M NaOH kod 300 W te nakon 6 minuta ekstrakcije ($28,77 \text{ mg g}^{-1}$). U istraživanju kojeg su proveli Beejmohun i sur. (2007) dobivena je koncentracija SDG-a $15,0 \text{ mg g}^{-1}$, prilikom ekstrakcije s 0,1 M NaOH kod 50 W i nakon 3 minute ekstrakcije. U istom istraživanju Beejmohun i sur. (2007) dobili su najvišu koncentraciju SDG-a ($16,1 \pm 0,4 \text{ mg g}^{-1}$) koristeći 1 M NaOH, neovisno o snazi mikrovalova i nakon 3 minute ekstrakcije, što je znatno manje od dobivenih rezultata u ovom istraživanju ($28,96 \text{ mg g}^{-1}$). Osim različitih uvjeta ekstrakcije (snage i vremena), razlog tome može biti ovisnost udjela lignana o sorti, klimatskim uvjetima i lokalitetu žetve (Beejmohun i sur., 2007). U istraživanju Nemes i Orsat (2011) prilikom mikrovalne ekstrakcije najviša koncentracija SDG-a postignuta je kod mase uzorka 1 g s 50 mL 0,5 M NaOH, snazi mikrovalova 135 W te nakon 3 minute ekstrakcije, a iznosi $21,45 \text{ mg g}^{-1}$. U istraživanju Corbin i sur. (2015) postignuta je koncentracija SDG-a $23,6 \pm 0,7 \text{ mg g}^{-1}$ prilikom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, dok su Renouard i sur. (2010) u svom istraživanju dobili koncentraciju SDG-a $20,5 \pm 3,8 \text{ mg g}^{-1}$, koristeći enzimatski potpomognutu ekstrakciju uz pomoć celulaze. Dobiveni rezultati navedenih istraživanja manji su od koncentracije SDG-a postignute u ovom istraživanju ($28,96 \text{ mg g}^{-1}$).

Usporedbom rezultata s vrijednostima dobivenim putem referentne metode ($21,98 \text{ mg g}^{-1}$) vidljiv je značajan porast u količini ekstrahiranog SDG-a. Sličan porast od 25% objavili su i Beejmohun i sur. (2007), gdje je koncentracija SDG-a porasla s $12,7 \text{ mg g}^{-1}$ uz 6 h ekstrakcije s 0,1 M NaOH na $16,3 \text{ mg g}^{-1}$ nakon 15 minuta mikrovalne ekstrakcije pri 150 W.



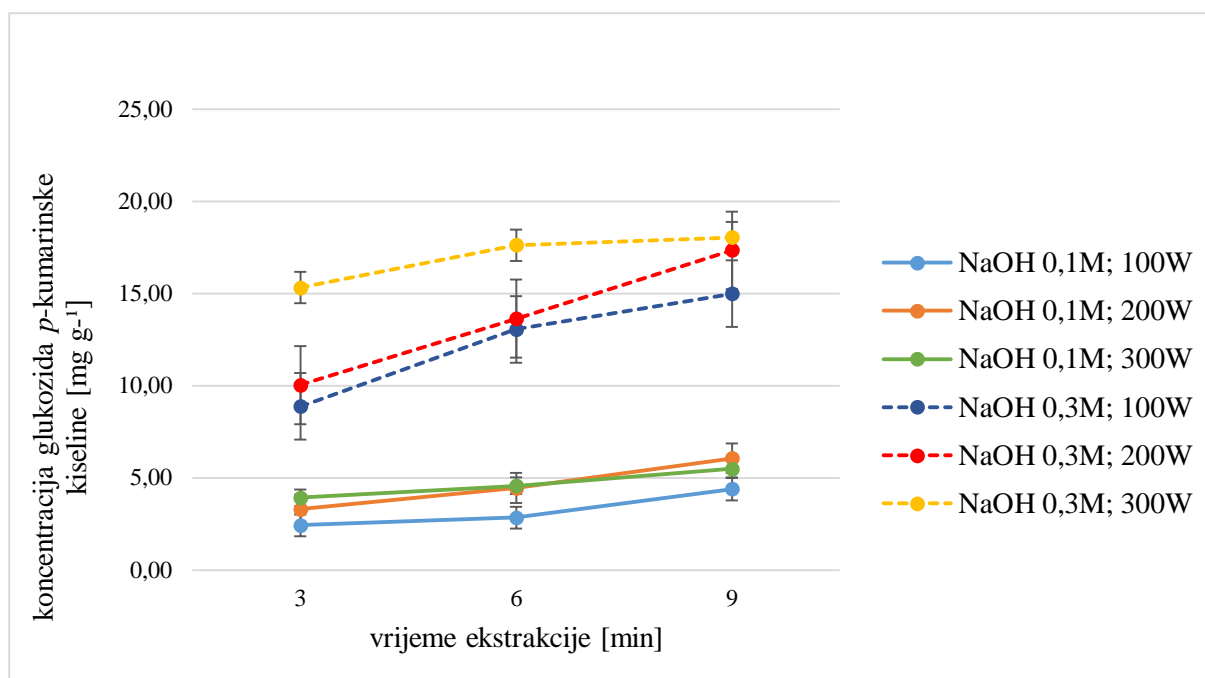
Slika 13. Faktorska analiza varijance ovisnosti koncentracije SDG-a o vremenu ekstrakcije kod tri različite snage mikrovalova ($p \leq 0,05$)

Faktorska analiza varijance (slika 13) pokazala je značajnu ovisnost ($p \leq 0,05$) koncentracije SDG-a o vremenu ekstrakcije kod različitih snaga mikrovalova. Uočeno je da se kod viših snaga mikrovalova (200 W i 300 W) koncentracija SDG-a smanjuje s vremenom ekstrakcije, moguće zbog njihovog negativnog djelovanja na strukturu istraživanih lignana. Suprotno tome, kod snage mikrovalova od 100 W koncentracija SDG-a raste s vremenom ekstrakcije. Optimalni rezultati se postižu pri mikrovalovima snage 200 W u trajanju od 3 minute.



Slika 14. Faktorska analiza varijance ovisnosti koncentracije SDG-a o molarnoj koncentraciji NaOH ($p \leq 0,05$)

Faktorska analiza varijance pokazala je značajnu ovisnost (slika 14) koncentracije ekstrahiranog SDG-a o molaritetu (0,1 i 0,3 M) NaOH. Učinkovitija ekstrakcija SDG-a postiže se s 0,1 M NaOH, u odnosu na 0,3 M NaOH. Nemes i Orsat (2012) u svom istraživanju, uspoređujući mikrovalnu ekstrakciju sa standardnim referentnim metodama, također navode pad koncentracije ekstrahiranog SDG-a korištenjem NaOH većeg molariteta. Uz 0,5 M NaOH i mikrovalnu ekstrakciju udjel SDG-a bio je 22,9 mg g⁻¹, klasičnom referentnom metodom s 0,3 M NaOH dobiveno je 18,0 mg g⁻¹ i klasičnom referentnom metodom s 1 M NaOH samo 16,8 mg g⁻¹.

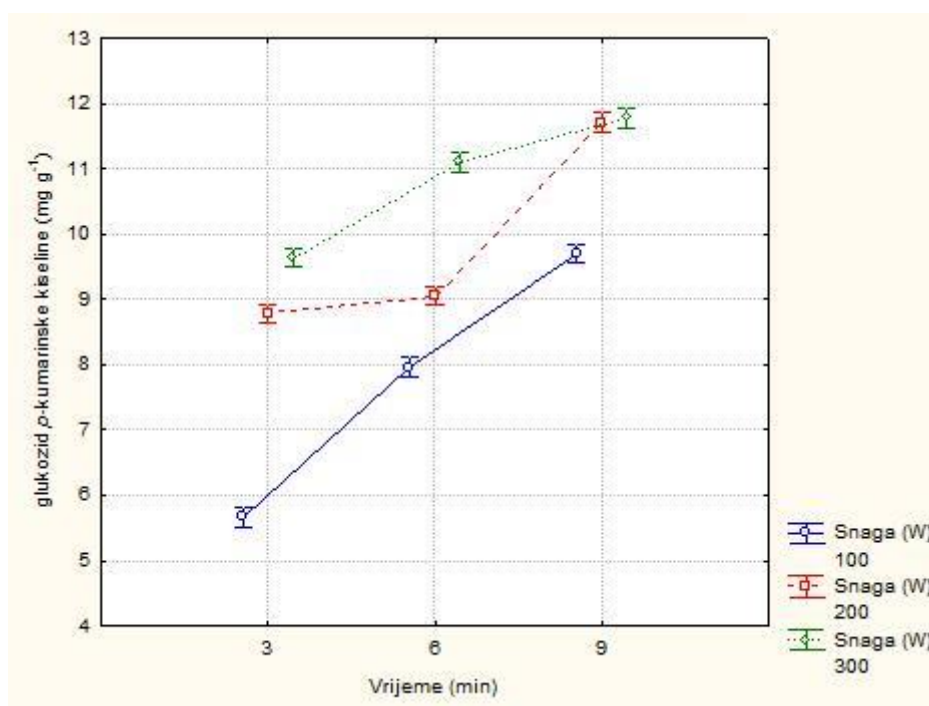


Slika 15. Ovisnost koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline o vremenu ekstrakcije kod tri različite snage mikrovalova s dvije različite molarne koncentracije NaOH

Na slici 15 prikazana je ovisnost koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline o vremenu ekstrakcije kod tri različite snage mikrovalova (100 W, 200 W i 300 W) s dva različita molariteta NaOH (0,1 M NaOH i 0,3 M NaOH). Koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline ekstrahiranog s 0,3 M NaOH više su kod svih upotrijebljenih snaga mikrovalova i različitih vremena, stoga je za ekstrakciju glukozida *p*-kumarinske kiseline učinkovitije otapalo s 0,3 M NaOH. Najviša koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline ($18,06 \text{ mg g}^{-1}$) postignuta je s 0,3 M NaOH kod 300 W i nakon 9 minuta. Nakon toga slijedi koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline $17,63 \text{ mg g}^{-1}$, koja je postignuta s 0,3 M NaOH kod 300 W i nakon 6 minuta.

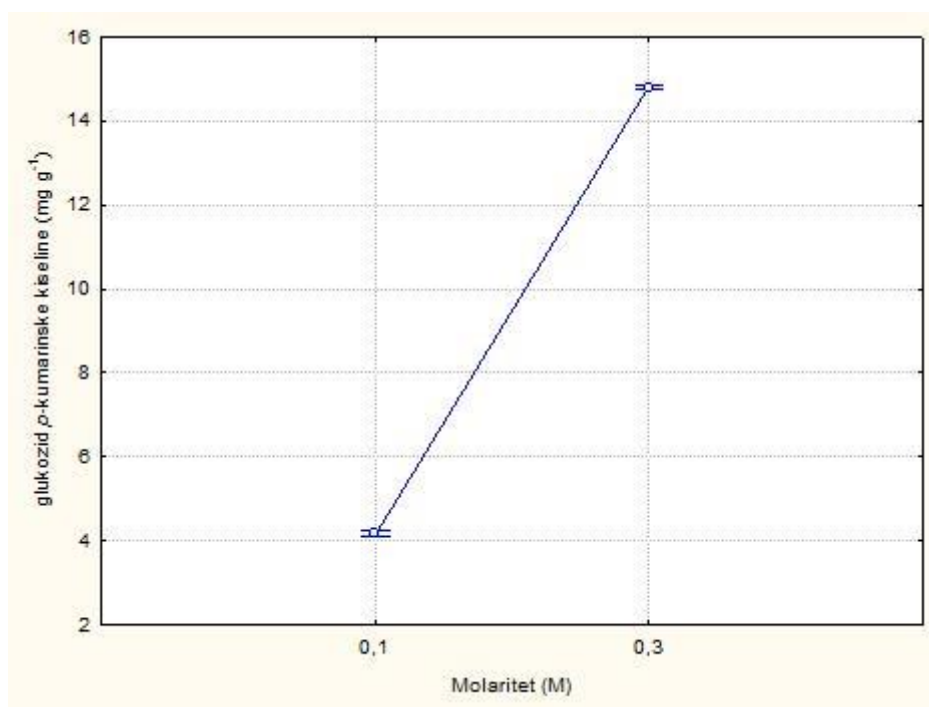
U istraživanju kojeg su proveli Beejmohun i sur. (2007) dobivena je koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline $3,7 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$, prilikom ekstrakcije s 1 M NaOH, neovisno o snazi mikrovalova i nakon 3 minute ekstrakcije. Dakle, dobivena koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline u ovom istraživanju ($18,06 \text{ mg g}^{-1}$) znatno je veća od koncentracije *p*-kumarinske kiseline dobivene u istraživanju Beejmohun i sur. (2007). Razlog tome može biti što je u ovom radu upotrijebljena veća snaga mikrovalova, 300 W te 0,3 M NaOH, ali i ovisnost udjela fenolnih spojeva lanenom sjemenu ovisno o sorti, klimatskim uvjetima i nešto manjoj mjeri, mjestu žetve (Beejmohun i sur., 2007). U istraživanju Corbin i sur. (2015) postignuta je koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline $5,0 \pm 0,3 \text{ mg g}^{-1}$ prilikom ekstrakcije

potpomognute ultrazvukom, dok su Renouard i sur. (2010) u svom istraživanju dobili koncentraciju glukozida *p*-kumarinske kiseline $3,9 \pm 0,5 \text{ mg g}^{-1}$, koristeći enzimatski potpomognutu ekstrakciju uz pomoć celulaze. Dobiveni rezultati navedenih istraživanja znatno su manji od koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline postignute u ovom istraživanju ($18,06 \text{ mg g}^{-1}$). Vrijednosti dobivene referentom metodom ($10,46 \text{ mg g}^{-1}$) su oko 42% su manje. Slične rezultate dobili su Beejmohun i sur. (2007), oko 35% manje glukozida *p*-kumarinske kiseline u usporedbi s mikrovalnom ekstrakcijom i 0,1 M NaOH.



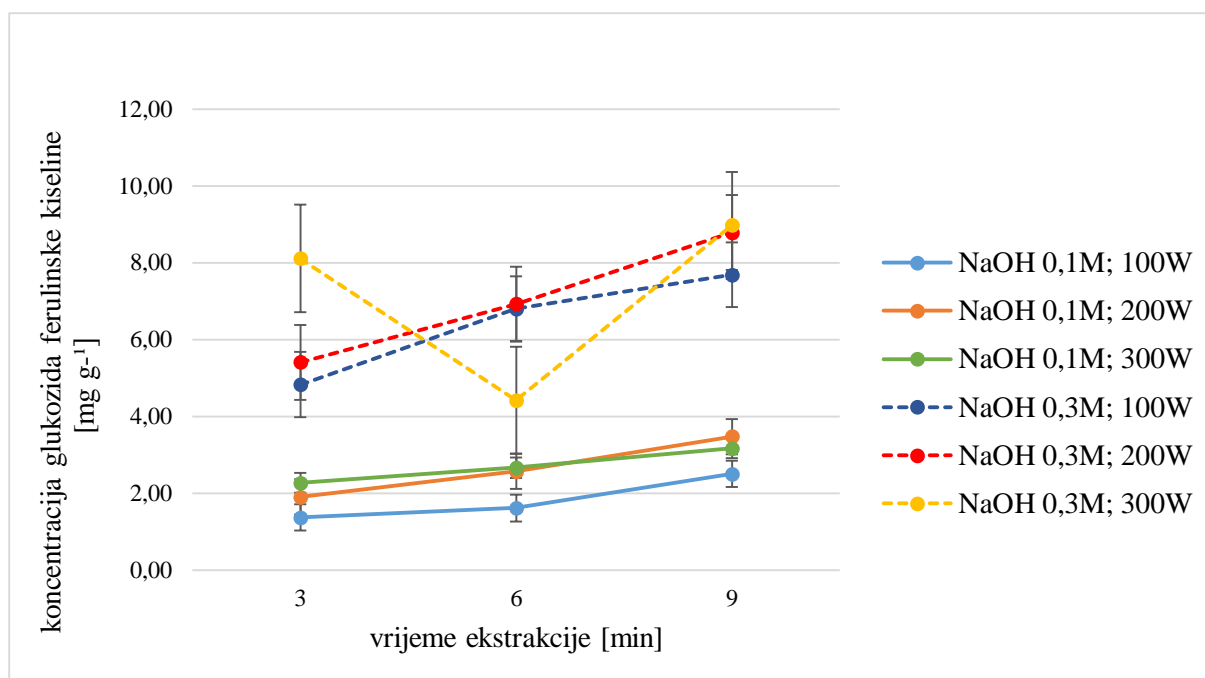
Slika 16. Faktorska analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline o vremenu ekstrakcije kod tri različite snage mikrovalova ($p \leq 0,05$)

Faktorska analiza varijance (slika 16) prikazuje ovisnost koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline o vremenu ekstrakcije kod snage mikrovalova od 100 W, 200 W i 300 W. S dužim vremenom ekstrakcije povećava se učinkovitost ekstrakcije glukozida *p*-kumarinske kiseline. Naime, najveća koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline postignuta je nakon 9 minuta ekstrakcije, kod svih primijenjenih snaga mikrovalova. Snagom mikrovalova od 300 W postignute su najveće koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline, neovisno o vremenu ekstrakcije, dok su najmanje koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline postignute kod 100 W. Optimalne vrijednosti postižu se pri 300 W i 6 min ekstrakcije.



Slika 17. Faktorska analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline o molarnoj koncentraciji NaOH ($p \leq 0,05$)

Slika 17 prikazuje ovisnost koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline o molaritetu NaOH. Veće koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline postižu se s 0,3 M NaOH u odnosu na 0,1 M NaOH pa je za ekstrakciju glukozida *p*-kumarinske kiseline učinkovitije otapalo s 0,3 M NaOH. Beejmohun i sur. (2007) objavili su oko 35% manju koncentraciju glukozida *p*-kumarinske pri standardnoj ekstrakciji i 0,1 M NaOH nego pri 1 M NaOH. Usporedba ovih molariteta pri mikrovalnoj ekstrakciji je pokazala značajnu razliku.

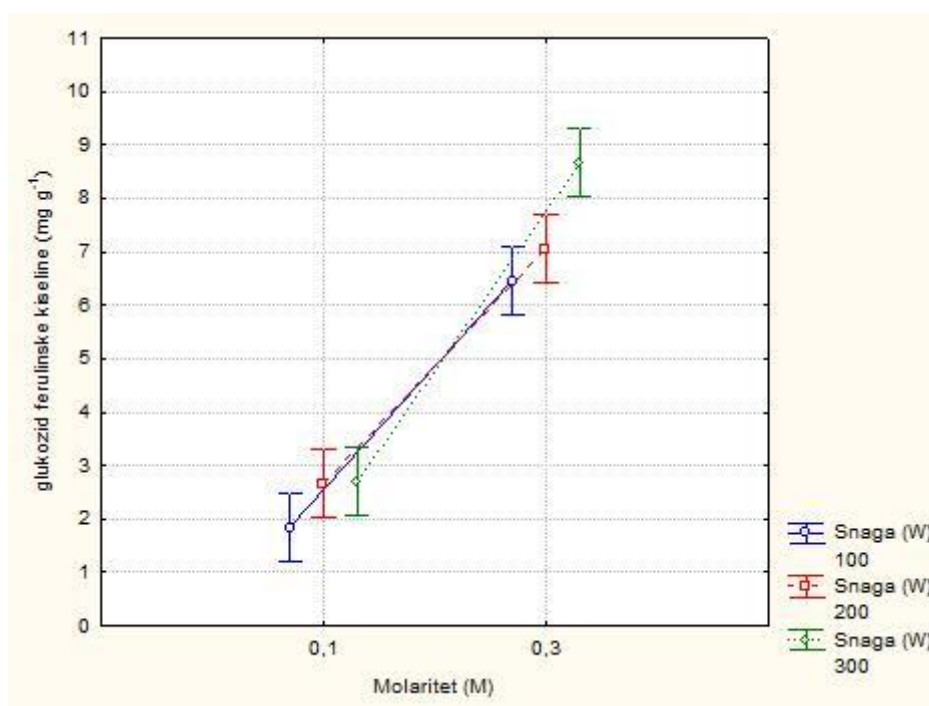


Slika 18. Ovisnost koncentracije glukozida ferulinske kiseline o vremenu ekstrakcije kod tri različite snage mikrovalova s dvije različite molarne koncentracije NaOH

Ovisnost koncentracije glukozida ferulinske kiseline o vremenu ekstrakcije kod tri različite snage mikrovalova (100 W, 200 W i 300 W) s dva različita molariteta NaOH (0,1 M NaOH i 0,3 M NaOH) prikazana je na slici 18. Za ekstrakciju glukozida ferulinske kiseline učinkovitije je otapalo s 0,3 M NaOH, budući da su koncentracije glukozida ferulinske kiseline ekstrahiranog s 0,3 M NaOH više kod svih upotrijebljenih snaga mikrovalova i različitih vremena. Najviša koncentracija glukozida ferulinske kiseline postignuta je s 0,3 M NaOH kod 300 W i nakon 9 minuta, a iznosi $8,98 \text{ mg g}^{-1}$. Zatim slijedi koncentracija glukozida ferulinske kiseline $8,79 \text{ mg g}^{-1}$, koja je postignuta s 0,3 M NaOH kod 200 W i nakon 9 minuta.

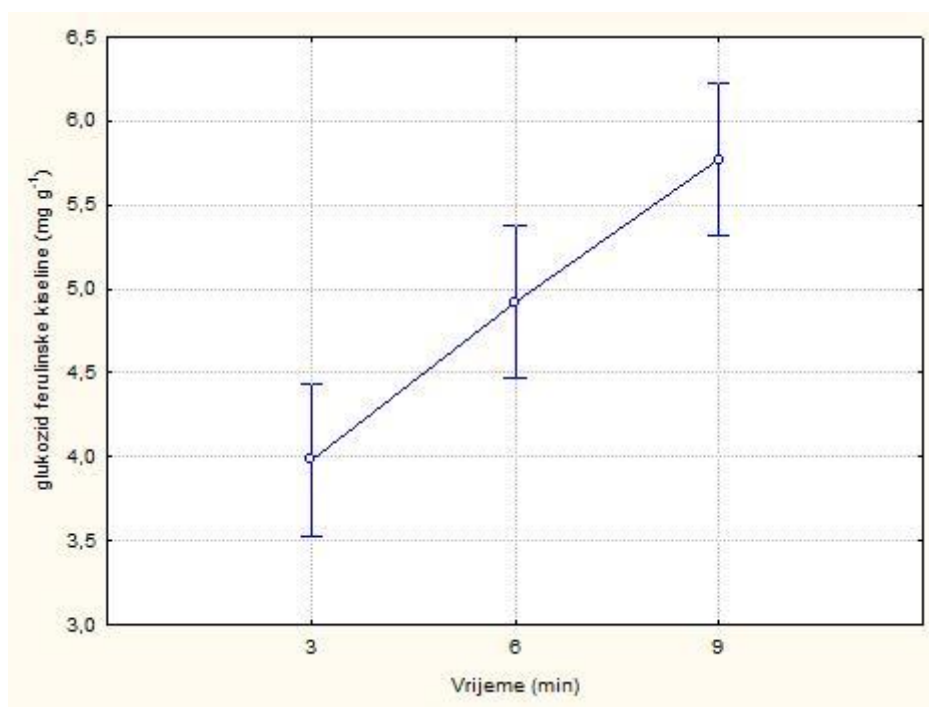
U istraživanju kojeg su proveli Beejmohun i sur. (2007) dobivena je koncentracija glukozida ferulinske kiseline $4,1 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$, prilikom ekstrakcije s 1 M NaOH, neovisno o snazi mikrovalova i nakon 3 minute ekstrakcije. Dobivena koncentracija glukozida ferulinske kiseline u istraživanju Beejmohun i sur. (2007) upola je manja od koncentracije glukozida ferulinske kiseline dobivene u ovom istraživanju ($8,98 \text{ mg g}^{-1}$). Razlog tome može biti što je u ovom istraživanju upotrijebljena snaga mikrovalova 300 W te 0,3 M NaOH, dok je u istraživanju Beejmohun i sur. (2007) upotrijebljena manja snaga mikrovalova, do 150 W te 1 M NaOH. Kao što je već rečeno, ovisnost udjela fenolnih spojeva u lanenom sjemenu ovisi o sorti, klimatskim uvjetima i, nešto manjoj mjeri, mjestu žetve (Beejmohun i sur., 2007). U istraživanju Corbin i sur. (2015) postignuta je koncentracija glukozida ferulinske kiseline $2,5 \pm$

0,1 mg g⁻¹ prilikom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, dok su Renouard i sur. (2010) u svom istraživanju dobili koncentraciju glukozida ferulinske kiseline $2,2 \pm 0,1$ mg g⁻¹, koristeći enzimatski potpomognutu ekstrakciju uz pomoć celulaze. Dobiveni rezultati navedenih istraživanja manji su od koncentracije glukozida ferulinske kiseline postignute u ovom istraživanju (8,98 mg g⁻¹). Rezultati dobiveni referentnom metodom (5,12 mg g⁻¹) manji su za oko 43 %. Beejmohun i sur. (2007) objavili su razliku od 53 % manje glukozida ferulinske kiseline kod referentne metode i 0,1 M NaOH nego pri mikrovalnoj ekstrakciji.



Slika 19. Faktorska analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida ferulinske kiseline o molariteta NaOH kod tri različite snage mikrovalova ($p \leq 0,05$)

Na slici 19 prikazana je ovisnost ($p \leq 0,05$) koncentracije glukozida ferulinske kiseline o molaritetu NaOH kod 100 W, 200 W i 300 W. S obzirom na molaritet NaOH, veća koncentracija glukozida ferulinske kiseline postiže se s 0,3 M NaOH, u odnosu na 0,1 M NaOH, neovisno o snazi mikrovalova. Najučinkovitija snaga mikrovalova je 300 W, budući da je kod 300 W ekstrahirana najveća koncentracija glukozida ferulinske kiseline. Zatim slijedi snaga mikrovalova 200 W, dok je najmanja koncentracija glukozida ferulinske kiseline ekstrahirana kod snage mikrovalova 100 W.



Slika 20. Faktorska analiza varijance ovisnosti koncentracije glukozida ferulinske kiseline o vremenu ekstrakcije ($p \leq 0,05$)

Faktorska analiza varijance (slika 20) prikazuje značajnu ovisnost koncentracije glukozida ferulinske kiseline o vremenu ekstrakcije. Uočeno je da je koncentracija glukozida ferulinske kiseline proporcionalna s vremenom ekstrakcije. Porastom vremena ekstrakcije raste i koncentracija glukozida ferulinske kiseline.

5. ZAKLJUČCI

1. Lanena pogača, dobivena nakon dvostrukog hladnog prešanja sadrži 10,3% ulja na suhu tvar uz iskorištenje procesa proizvodnje lanenog ulja od 79,85%.
2. U lanenoj pogači detektirani su: lignan sekoizolaricirezinol diglukozid (SDG) te glukozidi fenolnih kiselina, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline.
3. Ekstrakcijom na tresilici u trajanju od 5 sati najviša koncentracija SDG-a ekstrahirana je koristeći masu uzorka od 5 g (otapalo 70% metanola i 30% 0,1 M NaOH) i iznosi 27,56 mg g⁻¹; najviša koncentracije glukozida *p*-kumarinske kiseline i ferulinske kiseline ekstrahirana je koristeći masu uzorka od 1 g (otapalo 70% metanola i 30% 0,3 M NaOH) i iznosi 16,04 mg g⁻¹ i 8,86 mg g⁻¹.
4. Mikrovalnom ekstrakcijom najviša koncentracija SDG-a ekstrahirana uz otapalo od 70% metanola i 30% 0,1 M NaOH kod snage mikrovalova 300 W i nakon 3 minute ekstrakcije, a iznosi 28,96 mg g⁻¹. Najefikasnija ekstrakcija je kod 200 W i 3 minute ekstrakcije uz 0,1 M NaOH ($p \leq 0,05$).
5. Mikrovalnom ekstrakcijom najviša koncentracija glukozida *p*-kumarinske kiseline ekstrahirana je uz otapalo od 70% metanola i 30% 0,3 M NaOH kod snage mikrovalova 300 W i nakon 9 minuta ekstrakcije, a iznosi 18,06 mg g⁻¹. Najefikasnija ekstrakcija je kod 300 W i 6 minuta ekstrakcije uz 0,3 M NaOH ($p \leq 0,05$).
6. Mikrovalnom ekstrakcijom najviša koncentracija glukozida ferulinske kiseline ekstrahirana je uz otapalo od 70% metanola i 30% 0,3 M NaOH kod snage mikrovalova 300 W i nakon 9 minuta ekstrakcije, a iznosi 8,98 mg g⁻¹, kod ovih uvjeta se ujedno postiže i najefikasnija ekstrakcije ($p \leq 0,05$).
7. Ekstrakcija mikrovalovima smanjila je vrijeme ekstrakcije za 95% (maksimalno 9 minuta) uz povećanje udjela pojedinog spoja u rasponu od 25% do 43% u usporedbi s referentnom metodom.

6. LITERATURA

Ahmed, M. K., Daun, J. K., Przybylski, R. (2005) FT-IR based methodology for quantitation of total tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 in vegetable oils. *J. Food Compos. Anal.* **18**, 359-364.

Andrés-Lacueva, C., Medina-Remon A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., Zamora-Ros, R., Rotches-Ribalta, M., Lamuela-Raventos, R. M. (2010) Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability (de la Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G. A., ured.), Wiley-Blackwell, Iowa, str. 53-89.

B&B Podžumberak (2017) Seljačko domaćinstvo Podžumberak [online] <<http://www.podzumberak.com/de/smjestaj/lan/>>. Pristupljeno 02. ožujka 2017.

Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M. A., Mesnard, F. (2007) Microwave-assisted Extraction of the Main Phenolic Compounds in Flaxseed. *Phytochem. Anal.* **18**, 275-282.

Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3**, 32-47.

CCFO22 (2011) Codex Committee on Fats and Oils Twenty-second Session.

CCFO24 (2015) Codex Committee on Fats and Oils Twenty-fourth Session.

Cheyrier V. (2005) Polyphenols in food are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 223S-229S.

Choo, W., Birch, J., Dufour, J. (2007) Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *J. Food Compos. Anal.* **20**, 202-211.

Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A., Renouard, S., Blondeau, J.-P., Ferroud, C., Doussot, J., Lainé, E., Hano, C. (2015) Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrason. Sonochem.* **26**, 176-185.

Cvitanić, M. (2016) Izolacija fenolnih spojeva iz komine masline. Diplomski rad, Prehrambeno-Biotehnološki fakultet, Zagreb.

Čukelj, N., Jakasa, I., Sarajlija, H., Novotni, D., Ćurić, D. (2011) Identification and quantification of lignans in wheat bran by gas chromatography-electron capture detection. *Talanta* **84**, 127-132.

Deng, Q., Yu, X., Xu, J., Liu, C., Huang, F., Huang, Q., Yang, J. (2012) Effect of Flaxseed Oil Fortified with Vitamin E and Phytosterols on Antioxidant Defense Capacities and Lipids Profile in Rats. *J. Food Sci.* **77**, H135-H140.

El Gharas, H. (2009) Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *IJFST*. **44**, 2512–2518.

Eliasson, C., Kamal-Eldin, A., Andersson, R., Åman, P. (2003) High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction. *J. Chromatogr. A*. **1012**, 151-159.

FAOSTAT (2017) Crops processed, FAOSTAT - Statistics Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QD>>. Pristupljeno 15. ožujka 2017.

Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S., Sihag, M. (2014) Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *J. Food Sci. Technol.* doi: 10.1007/s13197-013-1247-9

Grunvald, A. K., Carvalho, C. G. P. D., Leite, R. S., Mandarino, J. M. G., Andrade, C. A. D. B., Scapim, C. A. (2014) Predicting the oil contents in sunflower genotype seeds using near-infrared reflectance (NIR) spectroscopy. *Acta Sci. Agron.* **36**, 233-237.

Gui, B., Shim, Y.Y., Dalta, R.S.S., Covello, P.S., Stone, S.L., Reaney, M.J.T. (2012) Identification and quantification of cyclolinopeptides in five flaxseed cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 8571-8579.

Gutiérrez, C., Rubilar, M., Jara, C., Verdugo, M., Sineiro, J., Shene, C. (2010) Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **10**, 454-463.

Hano, C., Martin, I., Fliniaux, O., Legrand, B., Gutierrez, L., Arroo, R. R. J., Mesnard, F., Lamblin, F., Lainé, E. (2006) Pinoresinol-lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum*) seeds. *Planta* **224**, 1291-1301.

Herceg, Z. (2009) Procesi konzerviranja hrane. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb.

Herchi, W., Arráez-Román, D., Trabelsi, H., Bouali, I., Boukhchina, S., Kallel, H., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutierrez, A. (2014) Phenolic Compounds in Flaxseed: A Review of Their Properties and Analytical Methods. An overview of the Last Decade. *J. Oleo Sci.* **63**, 7-14.

HRN EN ISO 659:2010, Uljarice - Određivanje udjela ulja (Referentna metoda).

HRN EN ISO 665:2004, Uljarice - Određivanje količine vode i hlapljivih tvari.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821-1835.

IUPAC-IUB (2000) LG-0 and LG-1 Introduction and Parent Structures, IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry/IUB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology, London. <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lignan/LG0n1.html#p11>>. Pristupljeno 18. ožujka, 2017.

Kasote, D. M. (2013) Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *IFRJ.* **20**, 27-34.

- Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **55**, 279-290.
- Kochhar, S. P. (2011) Minor and Speciality Oils. U: Vegetable Oils in Food Technology Composition, Properties and Uses, 2. izd. (Gunstone, F. D., ured.), Wiley-Blackwell, Chichester, str. 306-309.
- Koubaa, M., Mhemdi, H., Vorobiev, E. (2016) Influence of canola seed dehulling on the oil recovery by cold pressing and supercritical CO₂ extraction. *J. Food Eng.* **182**, 18-25.
- Kumar, V., Rani, A., Solanki, S., Hussain, S. (2006) Influence of growing environment on the biochemical composition and physical characteristics of soybean seed. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 188-195.
- Litvischenko, V. L., Nikiforov, I. Y., Ershov, I. V. (2017) Remote measurement of sunflower seed moisture content by the use of microwaves. *J. Sci. Food Agric.* doi: 10.1002/jsfa.8359
- Lovrić, T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva. HINUS, Zagreb.
- Meagher, L. P., Beecher, G. R., Flanagan, V. P., Li, B. W. (1999) Isolation and Characterization of the Lignans, Isolariciresinol and Pinoresinol, in Flaxseed Meal. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3173–3180.
- Mueller, K., Eisner, P., Yoshie-Stark, Y., Nakada, R., Kirchhoff, E. (2010) Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L.). *J. Food Eng.* **98**, 453-460.
- Muir, A. D., Westcott, N. D. (2003) Flax The genus *Linum*. Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Nemes, S. M., Orsat, V. (2011) Microwave-Assisted Extraction of Secoisolariciresinol Diglucoside—Method Development. *Food Bioprocess. Technol.* **4**, 1219-1227.

Nemes, S. M., Orsat, V. (2012) Evaluation of a Microwave-Assisted Extraction Method for Lignan Quantification in Flaxseed Cultivars and Selected Oil Seeds. *Food Anal. Methods*. **5**, 551-563.

Obranović, M., Škevin, D., Kraljić, K., Pospíšil, M., Neđeral, S., Blekić, M., Putnik, P. (2015) Influence of Climate, Variety and Production Process on Tocopherols, Plastochromanol-8 and Pigments in Flaxseed Oil. *Food Technol. Biotechnol.* **53**, 496-504.

Pali, V., Mehta, N. (2014) Evaluation of Oil Content and Fatty Acid Compositions of Flax (*Linum usitatissimum* L.) Varieties of India. *J. Agr. Sci.* **6**, 198-205.

Poeta, F. B., Rotundo, J. L., Borrás, L., Westgate, M. E. (2014) Seed water concentration and accumulation of protein and oil in soybean seeds. *Crop Sci.* **54**, 2752-2759.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001) Antioxidants in food: Practical applications. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Pravilnik o jestivim uljima i mastima (2012) *Narodne novine* **41**, Zagreb.

Procida, G., Stanicher, B., Cateni, F., Zacchigna, M. (2013) Chemical composition and functional characterisation of commercial pumpkin seed oil. *JSFA*. **93**, 1035-1041.

Przybylski, R. (2005) Flax Oil and High Linolenic Oils. U: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6. izd. (Shahidi, F., ured.), John Wiley & Sons, Inc., New-York, str. 281-301.

Rade, D., Mokrovčak, Ž., Štruelj, D. (2001) Priručnik za vježbe iz kemije i tehnologije lipida, Durieux, Zagreb.

Renouard, S., Hano, C., Corbin, C., Fliniaux, O., Lopez, T., Montguillon, J., Barakzoy, E., Mesnard, F., Lamblin, F., Lainé, E. (2010) Cellulase-assisted release of secoisolariciresinol from extracts of flax (*Linum usitatissimum*) hulls and whole seeds. *Food Chem.* **122**, 679-687.

Sharav, O., Shim, Y. Y., Okinyo-Owiti, D., Sammynaiken, R., Reaney J. T. (2014) Effect of cyclolinopeptides on the oxidative stability of flaxseed oil. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 88-96.

Siger, A., Józefiak, M. (2016) The effects of roasting and seed moisture on the phenolic compound levels in cold-pressed and hot-pressed rapeseed oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **118**, 1952-1958.

StatSoft Inc. (2008) STATISTICA (data analysis software system), verzija 8. <http://www.statsoft.com/>.

Šimić, B., Popović, R., Sudarić, A., Rozman, A., Kalinović, I., Ćosić, J. (2007) Influence of Storage Condition on Seed Oil Content of Maize, Soybean and Sunflower. *ACS*. **72**, 211-213.

Šubarić, D., Kopjar, M., Babić, J., Ačkar, Đ. (2010) Polifenoli i zdravlje. International seminar "Food supplements in health and disease". Zbornik radova, Tuzla, 32-39.

Toplak Galle, K. (2001) Domaće ljekovito bilje, 3. izd. (preveo Damir Biličić), Mozaik knjiga, Zagreb, str. 150-151.

Touré, A., Xueming, X. (2010) Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits. *CRFSFS*. **9**, 261-269.

Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231-1246.

Tsao, R., McCallum, J. (2010) Chemistry of Flavonoids. U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability (de la Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G. A., ured.), Wiley-Blackwell, Iowa, str. 131-155.

Uddin, Z., Jantad, S., Boonsupthip, W. (2016) Effect of Air Temperature and Velocity on Moisture Diffusivity in Relation to Physical and Sensory Quality of Dried Pumpkin Seeds. *Dry. Technol.* doi: 10.1080/07373937.2015.1119840

van Doosselaere, P. (2013) Production of Oils. U: Edible Oil Processing, 2. izd. (Hamm, W., Hamilton, R. J., Calliauw, G., ured.), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, str. 88-91.

Yanishlieva-Maslarova, N. V., Heinonen, I. M. (2001) Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. U: Atioxidants in food: Practical applications (Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., ured.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 210-248.

Zhang, Z., Li, D., Zhang, L, Liu, Y., Wang, X. (2013) Heating effect on the DSC melting curve of flaxseed oil. *J. Therm. Anal. Calorim.* doi: 10.1007/s10973-013-3270-5